

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II

Prof. Dr. Lars Maier

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Das Reaktionsverhalten der
Kalzium-Calmodulin-abhängigen ProteinkinaseII δ (CaMKII δ)
unter besonderer Berücksichtigung der
Autophosphorylierungsfähigkeit**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Saskia Ines Amlaz

2019

Für meinen Großvater

Wilhelm Mätzig

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II

Prof. Dr. Lars Maier

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Das Reaktionsverhalten der
Kalzium-Calmodulin-abhängigen ProteinkinaseII δ (CaMKII δ)
unter besonderer Berücksichtigung der
Autophosphorylierungsfähigkeit**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Saskia Ines Amlaz

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jonathan Jantsch

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, den 21. Februar 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Einführung in die Bedeutung der Thematik	7
1.2 Grundlagen der kardiovaskulären Physiologie.....	8
1.2.1 Physiologische Grundlagen der Herzerregung	8
1.2.2 Die elektromechanische Kopplung.....	8
1.2.3 Physiologische Grundlagen der Herzmechanik.....	10
1.2.4 Die Rolle vegetativer Regulationsmechanismen	10
1.3 Signaltransduktion.....	11
1.3.1 Grundprinzipien zellulärer Kommunikation und Informationsverarbeitung.....	11
1.3.2 Kalzium als sekundärer Botenstoff	11
1.3.3 Calmodulin	13
1.3.4 Katecholamine und die β -adrenerge Signaltransduktion.....	13
1.3.5 Signalwege des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	15
1.3.6 Die Proteinkinase A (PKA)	16
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und die NADPH-Oxidase 2.....	17
1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	17
1.4.2 Die Familie der NAD(P)H-Oxidasen (NOX).....	19
1.4.3 Die NAD(P)H-Oxidase 2 (NOX2; gp91 ^{phox}): molekulare Grundlagen und Aktivierungsmechanismen	19
1.4.4 Das NOX-ROS-System und Kardiopathologien	23
1.4.5 Der NOX2-Inhibitor gp91-ds-tat.....	23
1.5 Die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ)	24
1.5.1 Entdeckung und Klassifizierung.....	24
1.5.2 Isoformen, Gewebepräferenzen und Lokalisation.....	24
1.5.3 Molekülstruktur und Enzymregulation.....	25
1.5.4 Die Aktivierungswege der CaMKII	27
1.6 Ziele der vorgelegten Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Einführung in den Versuchsalgorithmus	31
2.2. Isolation von Kardiomyozyten der adulten Ratte	31
2.3. Viraler Gentransfer in Eukaryonten	35

2.3.1 Grundlagen des Gentransfers und der Adenoviren.....	35
2.3.2 Der Biosensor Ad-Camuia	36
2.3.4 Viruspräparation	38
2.3.5 Transduktionsprotokoll	40
2.4. Zellkultur transfizierter adulter Ratten-Kardiomyozyten	41
2.5. Konfokalmikroskopie	42
2.6 Epifluoreszenzmikroskopie	43
2.6.1 Das FRET-Phänomen	43
2.6.2 Die Grundlagen der Epifluoreszenzmikroskopie	47
2.7 Messprotokolle und Versuchsdurchführung.....	51
2.7.1 Messlösungen	51
2.7.2 Optimierung der elektrischen Feldstimulation	52
2.7.3 Versuchsdurchführung	53
2.8 Auswertung der Rohdaten	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Einführung in den Versuchsalgorithmus und Darstellung der Daten.....	56
3.2. Optimierung der Transduktions- und Versuchsbedingungen.....	57
3.2.1 Optimierung der Isolations- und Kulturbedingungen.....	57
3.2.2 Quantitative Ermittlung der Transduktionseffizienz	57
3.2.3 Zellqualitätsbestimmung anhand der Zellmorphologie	59
3.2.4 Auswahl der Versuchstierspezies	62
3.3 Stimulation mit elektrischer Feldstimulation und mit Isoproterenol.....	63
3.3.1 Der Versuchsalgorithmus	63
3.3.2 Originalregistrierung im Zytoplasma (Wildtyp (WT)).....	63
3.3.3 Gegenüberstellung von Wildtyp (WT)-Zellen und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma.....	65
3.3.4 Gegenüberstellung von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit CaMKII-Mutante (T2A) im Nukleus	68
3.3.5 Statistische Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten k	71
3.3.6 Statistische Gegenüberstellung der Amplituden.....	74
3.4 Kombinierte Anregung mit elektrischer Feldstimulation und mit Isoproterenol zur pharmakologischen Stimulation der β -Rezeptoren	76
3.4.1 Der Versuchsalgorithmus	76
3.4.2 Originalregistrierung im Zytoplasma (Wildtyp (WT)).....	76

3.4.3 Gegenüberstellung von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma.....	78
3.4.4 Gegenüberstellung von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Nukleus	80
3.4.5 Statistische Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten k.....	82
3.4.6 Statistische Gegenüberstellung der Amplituden.....	85
3.5 Stimulation mit Angiotensin II (ANGII)	88
3.5.1 Der Versuchsalgorithmus	88
3.5.2 Originalregistrierung im Zytoplasma (Wildtyp (WT)).....	90
3.5.3 Zytoplasmatische Reaktionsverläufe der Wildtyp-Zellen (WT) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT)	90
3.5.4 Zytoplasmatische Reaktionsverläufe der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT)	92
3.5.5 Nukleäre Reaktionsverläufe der Wildtyp-Zellen (WT) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT).....	95
3.5.6 Nukleäre Reaktionsverläufe der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT).....	97
3.5.7 Statistische Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten k.....	100
3.5.8 Statistische Gegenüberstellung der Amplituden.....	103
3.6 Gegenüberstellung der kinetischen Parameter (k und Amplitude) unter den Versuchsbedingungen von 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1.....	105
3.6.1 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten (k in s^{-1}).....	105
3.6.2 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivitäten (Amplituden in %).....	106
4. Diskussion	107
4.1 Optimierung der Versuchsbedingungen und Lösungsansätze bezüglich potentieller Störfaktoren	107
4.2 Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit ist vornehmlich von Ca^{2+}/CaM und nicht von der Autophosphorylierung abhängig	110
4.3 Die Autophosphorylierungsabhängigkeit der CaMKII-Aktivität.....	112
4.4 Oxidative Aktivierung der CaMKII	115
4.5 Gegenüberstellung der zellulären Mikrodomänen	118
4.5.1 Grundlagen	118
4.5.2 Nukleäre Reaktionskinetik unter elektrischer Feldstimulation.....	118
4.5.3 Nukleäre Reaktionskinetik unter β -adrenerger Stimulation	119
4.5.4 Nukleäre Reaktionskinetik unter Isoproterenol und unter elektrischer Feldstimulation	120
4.5.5 Nukleäre Reaktionskinetik unter Angiotensin II	120

4.6 Limitierungen der vorliegenden Arbeit und Ausblicke für zukünftige Forschungsprojekte.....	122
5. Zusammenfassung	123
6. Literaturverzeichnis.....	125
7. Anhang	142
7.1 Abkürzungsverzeichnis	142
7.2 Abbildungsverzeichnis	145
7.3 Formelverzeichnis	148
7.4 Tabellenverzeichnis.....	148
7.5 Danksagung	
7.6 Lebenslauf	
Erklärung.....	

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Bedeutung der Thematik

Die kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) gehören im 20. und 21. Jahrhundert zu den bedeutendsten Krankheitsentitäten. Ihre immer größer werdende Relevanz beruht auf der zunehmenden Prävalenz, den volkswirtschaftlichen Konsequenzen und der Lebensqualitätsminderung für den einzelnen Patienten. Bereits 1948 stellten die CVD die häufigste Todesursache in den Vereinigten Staaten dar und hatten 1989 mit 25% den größten Anteil an allen Todesursachen weltweit (WHO MONICA Project 1989). Im Jahr 2012 belegten die CVD mit einem Anteil von über 40 % noch vor malignen Erkrankungen (25,5%) den ersten Platz der deutschen Todesursachenstatistik (Gaber und Wildner 2011; Statistisches Bundesamt 2013). Die dadurch verursachten Kosten sind enorm: Allein in Deutschland sind CVD für 15% der Gesundheitsausgaben und 17 Millionen verlorener Erwerbstätigkeitsjahre verantwortlich (Löwel 2006). Ungeachtet der ökonomischen Belastungen bedeuten CVD für den betroffenen Patienten nicht nur eine Verkürzung der Lebenszeit, sondern auch eine nicht zu unterschätzende Minderung der Lebensqualität.

Neben Primärprävention und der optimalen Versorgung bereits Erkrankter rückt zunehmend die Entwicklung kurativer Therapieansätze in den Fokus und mit ihr die Kalzium-Calmodulin-abhängige ProteinkinaseII δ (CaMKII δ) als Schlüsselenzym der kardiovaskulären Grundlagenforschung. Ihre Relevanz ergibt sich aus der enzymatischen Multifunktionalität und der aktiven Beteiligung an der Genese gleich mehrerer Herzkreislaufpathologien wie Herzinsuffizienz, Arrhythmien und Remodelling nach Infarktereignissen (Mohler und Hund 2011; Fischer et al. 2013; Toischer et al. 2013; Erickson 2014).

Trotz unbestrittener Bedeutung als zukünftiges Therapie-Target sind die molekularen Funktionsprinzipien und Signalwege der CaMKII δ noch ungenügend erforscht. Als Beitrag zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse stehen die CaMKII δ und vor allem ihr Reaktionsverhalten und ihre Reaktionskinetik im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

1. Einleitung

1.2 Grundlagen der kardiovaskulären Physiologie

Wichtige physiologische Grundlagen für die Einordnung der CaMKII δ als Schlüsselenzym kardiovaskulärer Pathologien sind die elektromechanische Kopplung, sowie die Herzerregung und die Herzmechanik.

1.2.1 Physiologische Grundlagen der Herzerregung

Die Herzerregung fußt auf der myogenen Automatie, also der Fähigkeit des Myokards unabhängig von externen Nervenimpulsen elektrische Ladungen zu generieren (Schmidt et al. 2007). Erregungsbildungs-Zellen sind vor allem durch ihre HCN₄-Kationenkanäle mit dem resultierenden einwärtsgerichteten Natrium-Ionenstrom (i_f) in der Lage spontan zu depolarisieren. Der Sinusknoten fungiert mit der größten Dichte an HCN₄-Kanälen als übergeordneter Schrittmacher und leitet die Erregung über AV-Knoten, His-Bündel und Purkinje-Fasern über auf Arbeitsmyokardzellen. Deren K⁺-Einwärtsgleichrichter (K_{ir} 2.1) transportieren in nicht erregtem Zustand, bedingt durch das Kaliumgefälle zwischen Intra- und Extrazellularraum (140mmol/l vs. 4mmol/l), Kaliumionen kontinuierlich aus dem Zellinneren (i_{kl}) heraus. Das Ruhemembranpotential entspricht deshalb annähernd dem Nernst-Gleichgewichtspotential für Kalium (-90mV). Steigt die transmembranöse Spannung auf über -70mV werden die K⁺-Gleichrichter von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na_v 1.5) abgelöst. Der resultierende Natriumeinstrom in die Zelle (i_{Na}) verschiebt die transmembranöse Spannung in Richtung des Natrium-Gleichgewichts. Das entstehende Aktionspotential breitet sich über das gesamte Myokard aus. Die Übermittlung der elektrischen Signale und ihre kontraktile Umsetzung erfolgen interzellulär über die elektrisch leitenden Connexone der gap junctions und intrazellulär über die elektromechanische Kopplung. (Noble 1975; Berne und Levy 2001; Carmeliet und Vereecke 2001; Opie 2003; Katz 2010).

1.2.2 Die elektromechanische Kopplung

Der Begriff elektromechanische Kopplung (vgl. Abb. 1) beschreibt die kalzium-vermittelte Umsetzung elektrischer Impulse (Aktionspotentiale) in mechanische Muskelkontraktionen (Bers 2002). Wird eine Arbeitsmyokardzelle elektrisch erregt, breitet sich die Depolarisation über die Zellmembran bis zu den T-Tubuli aus und öffnet spannungsabhängige L-Typ-Ca²⁺-Kanäle. Bedingt durch das Kalzium-Ionengefälle zwischen Intra- und Extrazellularraum (10^{-7} mol/l vs. 10^{-3} mol/l) kommt es zu einem einwärtsgerichteten Kalziumstrom, der über die Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) die Freisetzung zusätzlicher Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (SR) triggert (CICR). Die im inaktiven Zustand durch Tropomyosin besetzte Myosinbindungsstelle an der Aktin-Untereinheit des Troponins wird durch die An-

1. Einleitung

bindung von Kalziumionen und die folgende Konformationsänderung freilegt. Durch die folgende Interaktion und das aneinander vorbeigleiten der Aktin- und Myosinfilamente (sliding filament-Mechanismus) wird das Sarkolem ohne Längenänderung der beiden Komponenten (Aktin, Myosin) verkürzt. Die notwendige Energie wird durch ATP-Spaltung erzeugt. Mit dem Ende des Aktionspotentials schließen sich die L-Typ-Kalziumkanäle und die intrazelluläre Kalziumkonzentration wird durch Transportmoleküle wie die sarkoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA) und membranständige Natrium/Kalzium-Austauscher wieder auf 10^{-7} mol/l normalisiert. Das Ausmaß der Kalziumfreisetzung bestimmt beim Myokard, als funktionelles Synzytium (single-unit-system), außerdem die Kraftmodulierung. (Kutscha und Brecht 1961; Geeves und Holmes 1999; Lamb 2000; Bers 2001; Schmidt et al. 2007; Pape et al. 2014).

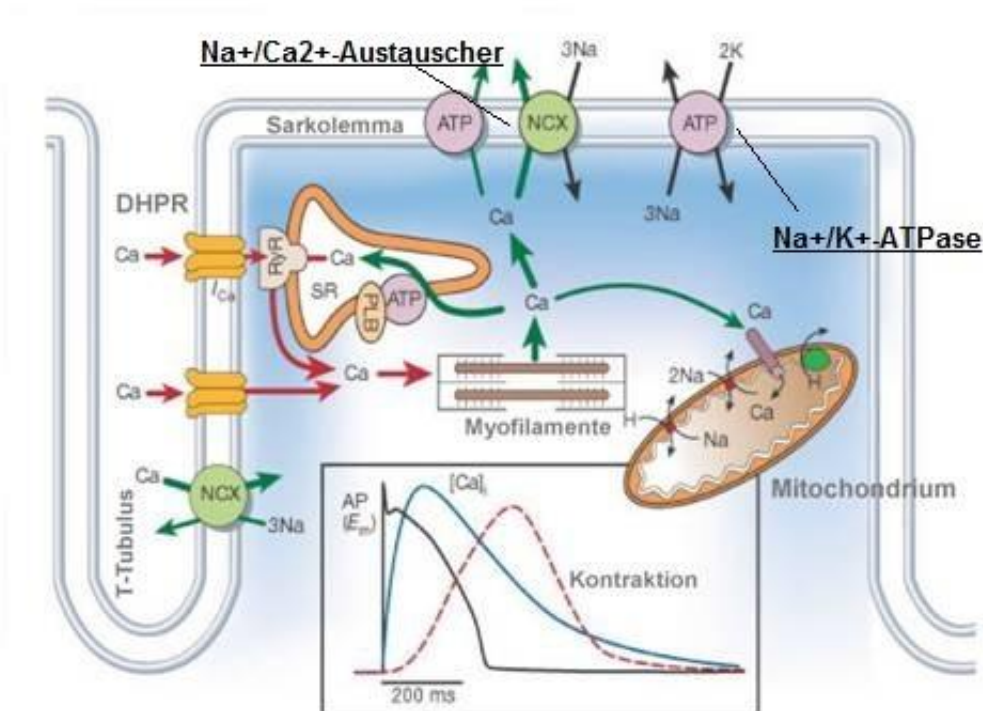


Abbildung 1 Die elektromechanische Kopplung. Die roten Markierungen zeigen den Kalziumeinstrom von extrazellulär und aus den intrazellulären Speichern. Die Wiederherstellung des ursprünglichen Kalziumgleichgewichts ist durch grüne Pfeile dargestellt. Modifiziert nach BERS (2002).

1. Einleitung

1.2.3 Physiologische Grundlagen der Herzmechanik

Hauptaufgabe des Herzens ist die Aufrechterhaltung einer suffizienten Blutzirkulation. Dabei ist das Herz in der Lage sich über die Regulation von Volumen und Druck oder auch von Vorlast und Nachlast an äußere Anforderungen anzupassen. Die Vorlast ist abhängig vom venösen Blutrückfluss in der Diastole. Die Nachlast entspricht der Muskelfaserspannung zum Zeitpunkt der systolischen Klappenöffnung und ist abhängig vom peripheren Gefäßwiderstand. Volumen- oder Druckschwankungen werden mit dem Frank-Starling-Mechanismus ausgeglichen (Patterson et al. 1914; Patterson und Starling 1914), der sich intrazellulär auf eine gesteigerte Kalzium-Sensitivität zurückführen lässt. Er spielt vor allem eine Rolle bei Lagerungswechseln während die Erhöhung des Herzzeitvolumens bei körperlicher Leistungssteigerung Folge vegetativer Einflussnahme ist (Schmidt et al. 2007).

1.2.4 Die Rolle vegetativer Regulationsmechanismen

Der Begriff des autonomen Nervensystems wurde 1898 von dem britischen Physiologen John Newport Langley geprägt, der erstmals die Steuerung vitaler Körperfunktionen durch neuronale Fasern, unabhängig von willkürlichen Impulsen, beschrieb (Langley 1898a; Langley 1898b). Der Sympathikus stimuliert über Katecholamine vor allem β_1 -Rezeptoren und phosphoryliert über die einsetzenden Signalkaskaden (vgl. 1.3.4) intrazelluläre Zielmoleküle (RyR2, SERCA, HCN₄-Kanäle). Die positiv inotropen, lusitropen, bathmotropen und chronotropen Effekte (Katz 2010; Berne und Levy 2001) steigern in ihrer Gesamtheit das HZV. Unterstützende Nebeneffekte sind die α -adrenerg vermittelte Vasokonstriktion und die RAAS-Aktivierung: Die Erhöhung von Nach- und Vorlast beschleunigt die muskuläre Verkürzungsgeschwindigkeit und begünstigt den positiv inotropen Effekt. Diese gesteigerte Herzleistung scheint allerdings nur für kurze Perioden ausgelegt zu sein, da chronische Aktivierungen zur myokardialen Erschöpfung mit Hypertrophie, Herzinsuffizienz und Rhythmusstörungen führen. Ebenso führt eine anhaltende RAAS-Aktivität durch Wasser- und Natriumresorption zur stetigen Volumenbelastung mit Entwicklung eines arteriellen Hypertonus. Anhaltend hohe Aldosteronspiegel regen Fibroblasten an und führen über ventrikuläres Remodelling zur diastolischen Dysfunktion. Die aktuelle Studienlage legt nahe, dass diese kardiotoxischen Wirkungen auch auf einer gesteigerten CaMKII-Expression/-Aktivierung beruhen (Grimm und Brown 2010; Mohler und Hund 2011; Fischer et al. 2012; Erickson 2014).

1. Einleitung

1.3 Signaltransduktion

1.3.1 Grundprinzipien zellulärer Kommunikation und Informationsverarbeitung

Mehrzellige Organismen sind durch Arbeitsteilung und Spezialisierung zu komplexeren Leistungen fähig als Einzeller, erkaufen sich dies allerdings mit dem Verlust der zellulären Autonomie (Rassow et al., S. 536–554). Die dadurch notwendige Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen wird gewährleistet durch ein ineinandergreifendes inter- und intrazelluläres Botenstoffsystem (Löffler et al. 2006, S. 757–808). Für das Myokard und die CaMKII sind vor allem die kalzium-camodulin-abhängigen und die β -adrenergen Signalwege, sowie das RAAS-System von Bedeutung.

1.3.2 Kalzium als sekundärer Botenstoff

Im Jahr 1883 publizierte der britische Physiologe Sydney Ringer, dass eine Herzmuskelkontraktion, trotz vollständig intakter Kardiomyozyten, ohne Kalzium nicht möglich ist (Ringer 1883). Grund dafür ist die Rolle der Kalziumionen als sekundäre Botenstoffe in der kardialen Informationsverarbeitung (Bers 2002). Zusätzlich ist ein konstanter Kalziumspiegel innerhalb enger Grenzen überlebenswichtig für alle Zellen, da Schwankungen über mechanische Membranschäden und sekundäre Kalzium-Überladung zu Hyperkontraktion und zum Zelltod führen (Kalzium-Paradoxon) (Zimmerman und Hülsmann 1966; Muir 1967; Zimmerman et al. 1967). Die Kalziumionen befinden sich unter Ruhebedingungen im Extrazellulärraum und in intrazellulären Speichern (ER, SR, Mitochondrien) (Rassow et al., S. 367–373, 544–555). Bei Zellerregung bewirken die Aktivierung membranständiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und die direkte oder spannungsabhängige Öffnung von Kalziumkanälen (vgl. 1.2.1 und 1.2.2) eine Verschiebung der Kalziumionen in das Zytosol. Die Bindung endokriner Moleküle an G_q -Proteine aktiviert über deren α -Untereinheit die Phospholipase $C\beta$ (PLC β). Diese katalysiert die Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). DAG verbleibt über einen Lipidanker in der Zellmembran und aktiviert im Komplex mit Kalzium die Proteinkinase C, eine an der Zelldifferenzierung beteiligte Serin-Threonin-Kinase (Rebecchi und Pentyala 2000). IP₃ diffundiert im Zytosol und aktiviert IP₃-sensitive ER-Kalziumkanäle mit konsekutiver Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern (vgl. Abb. 2). Die Kalzium-Ruhekonzentration steigt von 10^{-7} mol/l auf ca. 10^{-5} mol/l. Zusätzlich können in geringerem Ausmaß auch Kalziumionen aus Mitochondrien mobilisiert werden (Rassow et al., S. 367–372). Die Entleerung der intrazellulären Speicher sti-

1. Einleitung

multiert zusätzlich den Kalziumeinstrom über membranöse Kalziumkanäle (CRAC). Bei Stimulationsende wird das ursprüngliche Kalziumgefälle durch Kalzium-ATPasen (SERCA, PMAC), Natrium-Kalzium-Antiporter und energieunabhängige Kalzium-Uniporter wieder hergestellt. Die freigesetzten Kalziumionen fungieren vor allem als sekundäre Botenstoffe: Sie bilden Ionen-Protein-Komplexe und beeinflussen durch die dadurch frei werdende Energie und die konsekutive Konformationsänderung den Aktivitätszustand des Zielmoleküls (Boron und Boulpaep 2002; Löffler et al. 2006; Alberts et al. 2007). Die Zellantwort ist abhängig von der zellulären Ausstattung, der Interaktion mit anderen Signalketten und der zeitlichen Abfolge der Kalziumsignale: Oszillationen fördern Genexpression und Zellproliferation, während dauerhaft erhöhte Kalziumkonzentration über die Aktivierung der Scramblase zur Apoptose führen (Schmidt et al. 2007, S. 32–39; Malvezzi et al. 2013; Brunner et al. 2014). Außerdem kann Kalzium im Komplex mit dem ubiquitären, intrazellulären Kalziumsensor Calmodulin agieren und so unter anderem auch die CaMKII aktivieren (vgl. Abb. 2).

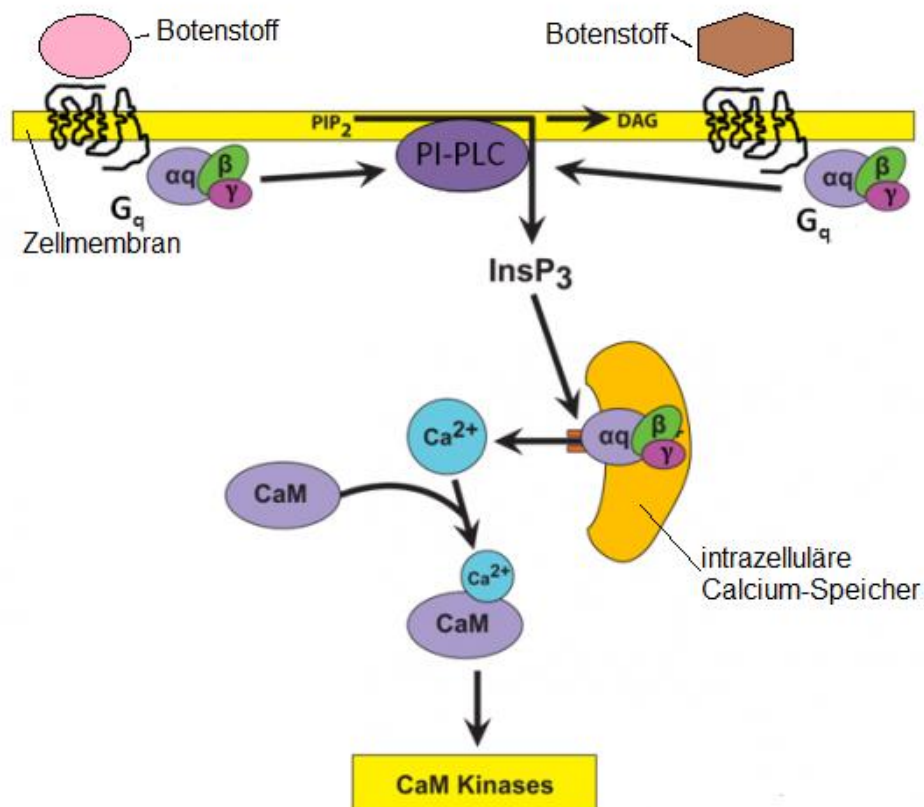


Abbildung 2 Die kalzium-calmodulin abhängige Aktivierung der CaMK. Modifiziert nach (Calcium - calmodulin - CaM kinases | Pancreapedia).

1. Einleitung

1.3.3 Calmodulin

In den 1960/-70er Jahren identifizierte der US-amerikanische Biochemiker W.Y. Cheung ein Protein, das im Komplex mit Kalziumionen den Aktivierungszustand von Enzymen modulieren konnte und das, in Anlehnung an seine Rolle als intrazellulärer Kalziumrezeptor, als Calcium dependent regulator bezeichnet wurde. Später etablierte sich der Begriff Calmodulin (CaM) als Abkürzungsform von Calcium-modulated Protein (Cheung 1967; Cheung 1969; Cheung 1970; Cheung et al. 1978).

Das CaM-Molekül besitzt zwei globuläre Strukturen, die über eine α -Helix miteinander verbunden sind, und die Kalziumbindungsstellen (EF-Motiv) beinhalten. Bei ausreichend hohen Kalziumkonzentrationen kann CaM je zwei Kalziumionen am N- und C-Terminus binden und exponiert durch die konsekutive Konformationsänderung methioninreiche hydrophobe Seitenketten. CaM wird dadurch zum allosterischen Aktivator (Voet 2002, S. 472–474; Volkmann et al. 2014; Rassow et al., S. 553–555) und kann beispielsweise bei der CaMKII, der MLCK, der Adenylatzyklase und der eNOS über einen sogenannten intrasterischen Mechanismus die Aufhebung der enzymatischen Autoinhibition bewirken (Hudmon und Schulman 2002b; Voet 2002, S. 475). Dies spielt vor allem eine Rolle für die β -adrenerge und die RAAS-abhängige Signaltransduktion.

1.3.4 Katecholamine und die β -adrenerge Signaltransduktion

Katecholamine sind Botenstoffe, die die Anpassung des Organismus an Stresssituationen vermitteln. Ihre Entdeckung und Beschreibung geht zurück auf die britischen Physiologen G. Oliver und E. A. Schäfer, die Adrenalin als erstes Hormon aus der Nebennierenrinde extrahieren und seine Wirkung auf das Herzkreislaufsystem nachweisen konnten (Oliver und Schäfer 1895a; Oliver und Schäfer 1895b).

Die Katecholamine werden in intrazellulären Vesikeln gespeichert, die bei der Entstehung eines Aktionspotentials kalziumabhängig mit der Zellmembran fusionieren und als endokrine Botenstoffe oder als Transmitter nach extrazellulär abgegeben werden. Über Anbindung an Adrenorezeptoren werden die extrazellulären Signale in Informationskaskaden konfiguriert. Die bisher beschriebenen neun G-Protein-gekoppelte Adrenorezeptoren lassen sich in drei Gruppen mit je drei Unterformen einteilen: α_1 - (A/B/C), α_2 - (A/B/C) und β - (1/2/3) Rezeptoren. Während die α_1 -Rezeptoren über G_q und die PLC β stimulierend auf glatte Muskeln und die Glukogenolyse wirken, wirken α_2 -Rezeptoren über G_i und die Adenylatzyklase inhibitorisch. Die β -Rezeptoren beeinflussen unter anderem über noch nicht abschließend geklärte Signalwege die CaMKII (vgl. Abb. 3). Verbrauchte Katecholamine können entweder

1. Einleitung

wieder intrazellulär gespeichert oder durch Monoaminoxidasen (MAO) und Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) abgebaut werden (Aktories et al. 2013, S. 117–122, 162–180; Rassow et al., S. 545–551, 577–582).

Bezogen auf den Herzmuskel sind vor allem die β_1 -Rezeptoren von Bedeutung, da diese die zellulären Antworten der Kardiomyozyten und die renale Reninfreisetzung vermitteln (vgl. 1.2.4). Dabei ist die Stimulation auch durch synthetische Stoffe wie das β -selektive Adrenalin-Derivat Isoprenalin/Isoproterenol möglich ist. Durch einen N-Isopropyl-Substituenten und die damit einhergehende starke β -Selektivität eignet sich Isoproterenol im experimentellen Setting hervorragend zur Nachbildung sympathischer Signalimpulse am Herz (Aktories et al. 2013, S. 168–173). Aus klinischer Sicht ist die β -adrenerge Stimulation von Interesse, da chronische Reize über die CaMKII an der Entstehung kardialer Hypertrophien, Arrhythmien und kardiomyozytären Zelluntergang beteiligt zu sein scheinen (Bers und Grandi 2009; Grimm und Brown 2010; Mohler und Hund 2011) und die Lebenserwartung von Patienten mit Herzmuskelinsuffizienz umso geringer ist, je höhere Noradrenalin-Plasmaspiegel gemessen werden (Rouleau et al. 1993).

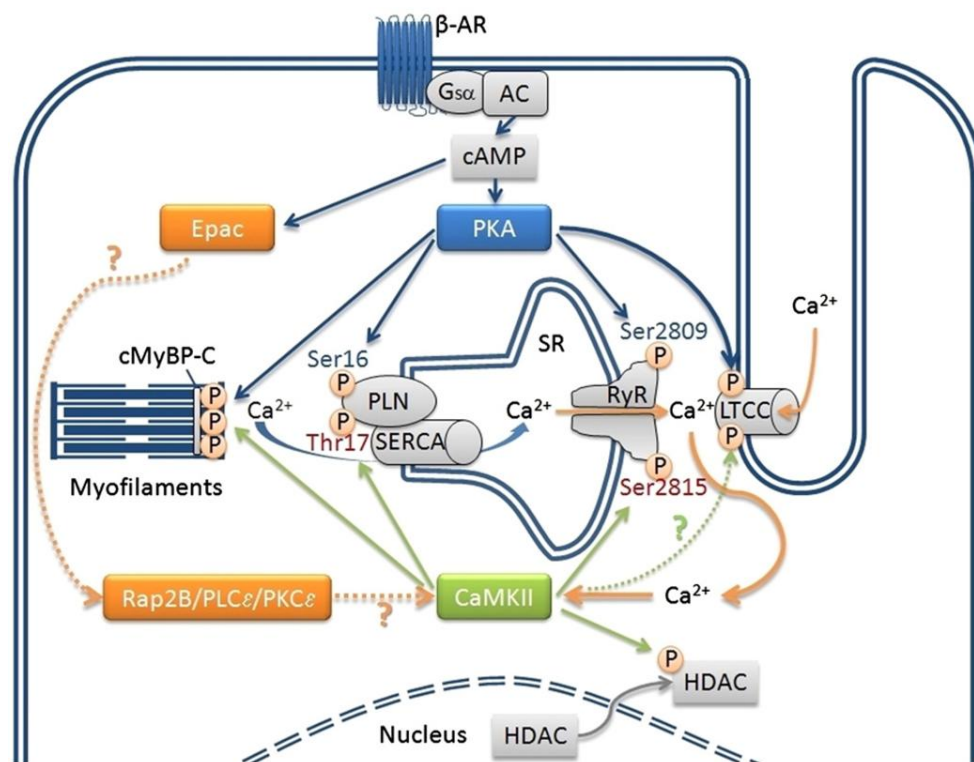


Abbildung 3 Die kardiale β -adrenerge Signaltransduktion und die Rolle von PKA und CaMKII (Grimm und Brown 2010).

1. Einleitung

1.3.5 Signalwege des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Der Begriff Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beschreibt eine hormonelle Signalkaskade zur Aufrechterhaltung von Plasmavolumen, Osmolarität und Blutdruck (Pschyrembel und Pschyrembel-Redaktion 2013). Die im Juxtaglomerulären Nierenapparat synthetisierte Endopeptidase Renin wurde 1898 erstmals von Robert Tigerstedt beschrieben (Kunikullaya U et al. 2012) und leitet bei drohendem HZV- und Blutdruckabfall mit konsekutiver, peripherer Minderperfusion die Gegensteuerung durch das RAAS ein. Auslösende Warnsignale sind eine renale Minderperfusion, eine verminderte NaCl-Konzentration im distalen Tubulus und β_1 - oder β_2 -Aktivierung als Ausdruck eines unzureichenden intravasalen Blutvolumens.

Renin wird aus Prorenin gebildet und wandelt mit dem pulmonalen Angiotensin converting Enzyme (ACE) das hepatische Prohormon Angiotensinogen über Angiotensin I zum Effektormolekül Angiotensin II (ANGII), das über die Aktivierung membranständiger AT1- und AT2-Rezeptoren zu Vasokonstriktion, Flüssigkeitsretention und kardiovaskulärer Hypertrophie führt. Zu beachten ist, dass die AT2-Rezeptoren vorwiegend in der Fetalperiode exprimiert werden und ihre genauen Funktionen noch weitestgehend ungeklärt sind. Über die gekoppelten G_q - und G_{12} -Rezeptorproteine wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, und die Adenylatzyklase und die Phospholipase A_2 gehemmt. Die PLC bewirkt über den in Abschnitt 1.3.2 (vgl. Abb. 2) geschilderten Signalweg eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die zur Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes, zur GFR-Steigerung und zu erhöhter Adrenalin- und Noradrenalin-Ausschüttung führt. Die DAG aktivierte Proteinkinase C vermittelt die Expression von Protoonkogenen, die vermutlich für die proliferativen Wirkungen an glatten Muskelzellen und am Myokard unter chronischer RAAS-Aktivierung verantwortlich sind (Löffler et al. 2006; Schmidt et al. 2007; Aktories et al. 2013; Pape et al. 2014). Des Weiteren werden das Mineralokortikoid Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde und das Vasopressin aus dem Hypophysenhinterlappen IP3-vermittelt freigesetzt. ANGI und Aldosteron hemmen rückkoppelnd die weitere Ausschüttung von Renin. Klinisch von Bedeutung ist das RAAS, da eine Überstimulation bzw. eine chronische Aktivierung vermutlich CaMKII-vermittelt, förderlich für Kardiopathologien, insbesondere die Herzinsuffizienz zu sein scheint (Purohit et al. 2013; Cheyou et al. 2014; Saura et al. 2014; Xie et al. 2014; Wagner et al. 2014). Eine besondere Rolle scheinen dabei reaktive Sauerstoffspezies und oxidationsvermittelte Signale zu spielen.

1. Einleitung

1.3.6 Die Proteinkinase A (PKA)

Die Proteinkinase A ist eine intrazelluläre Serin-Threonin-Kinase, die durch den second messenger cAMP aktiviert wird und G-Protein-gekoppelte Signale (vgl. 1.3.2) vermittelt. Das Heterotetramer (R_2C_2) besteht aus zwei regulatorischen Untereinheiten, die cAMP binden und aus zwei katalytischen Untereinheiten mit Bindungsstellen für das Co-Enzym ATP und die Substrate. Binden zwei cAMP-Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten, können die katalytischen Untereinheiten dissoziieren und Substrate unter ATP-Verbrauch phosphorylieren (vgl. Abb. 4). Reguliert wird die Enzymaktivität durch die cAMP-Konzentration, den subzellulären Aufenthaltsort und durch einen Feedback-Kontrollmechanismus: Die PKA aktiviert unter anderem cAMP-Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP zu AMP hydrolysieren, dadurch die cAMP-Konzentration senken und die PKA-Aktivität verhindern.

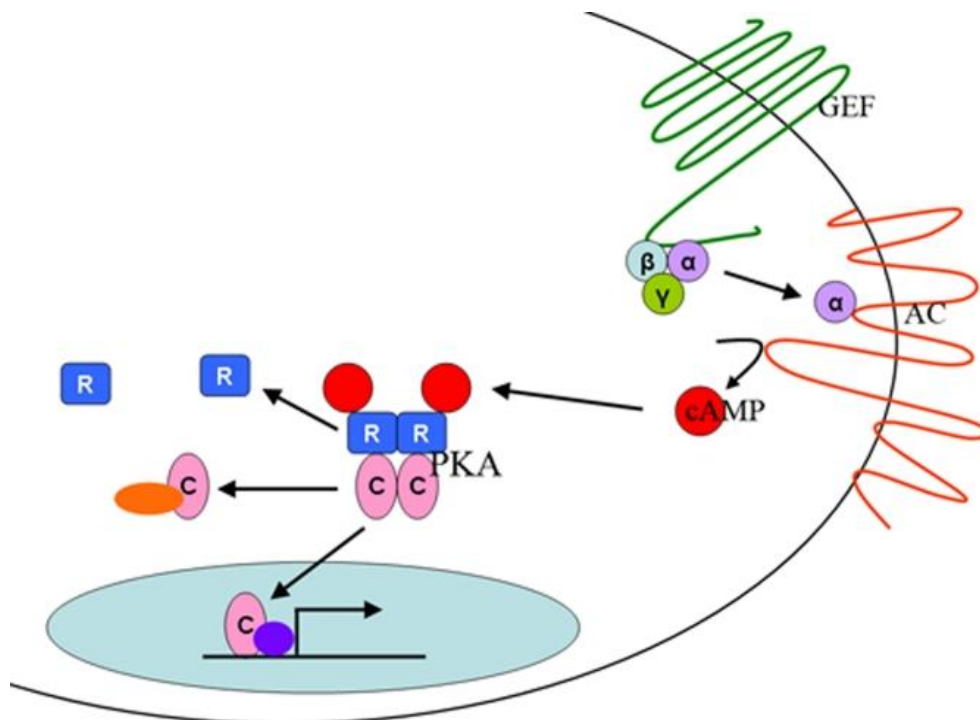


Abbildung 4 G-Protein-gekoppelter Signalweg der Proteinkinase A (Enns et al. 2010)

Im Zytoplasma spielt die PKA vor allem im Fettstoffwechsel eine wichtige Rolle. Bezogen auf die Herzmuskelzellen vermittelt sie die positiv inotropen, chronotropen und lusitropen Wirkungen des Sympathikus: Sie phosphoryliert im Zytoplasma Phospholamban, L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Ryanodin-Rezeptoren. Die Folge ist ein gesteigerter Einstrom in das SR durch Enthemmung der SERCA2 und ein gesteigerter Kalzium-Einstrom ins Zytoplasma während der Systole. Bei anhaltender Wirkung resultiert im Mausmodell eine dilatative Kardiomyopathie (Antos et al. 2001).

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und die NADPH-Oxidase 2

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Der menschliche Organismus ist kontinuierlich mit pathogenen Mikroorganismen konfrontiert und nutzt zu deren Bekämpfung auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Man unterscheidet zwischen freien Radikalen, angeregten Sauerstoffmolekülen und molekularen Oxidantien. Letztere lassen sich leicht in Sauerstoffradikale konvertieren (Bedard und Krause 2007). Zu den wichtigsten ROS zählt der angeregte Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), das Hyperoxid- oder auch Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$), das Peroxyl- ($\text{ROO}\cdot$) und das Hydroperoxyl-Radikal ($\text{HOO}\cdot$), das Alkoxyradikal ($\text{RO}\cdot$), Hydroperoxid (ROOH) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Ozon (O_3).

Am Anfang der ROS-Generierung steht die Bildung des Hyperperoxid- oder Superoxid-Anions durch enzymatische Übertragung von Elektronenpaaren auf Sauerstoffmoleküle (vgl. Abb. 5). Durch Disproportionierung entsteht aus zwei Superoxid-Radikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) H_2O_2 und O_2 (Elstner 1990). Diese Reaktion erfolgt spontan, bei niedrigen pH-Werten, oder wird durch die Hyperoxid-Dismutase katalysiert (Babior et al. 1973; Bedard und Krause 2007).

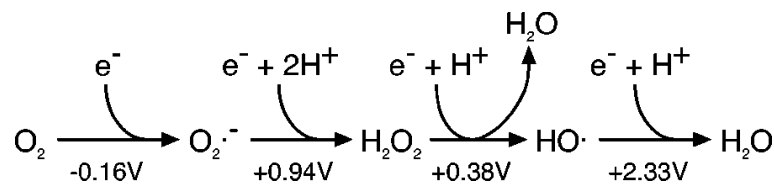


Abbildung 5 Generierung von ROS und deren Reduktionspotentiale aus (Imlay 2003).

Die aktivierten O_2 -Verbindungen oxidieren mit ihren freien Elektronenpaaren DNA, Proteine und Lipide und wirken auf diese Weise zytotoxisch (Bedard und Krause 2007; Phaniendra et al. 2015). Bei Inflammationen bilden die phagozytierenden Zellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten) ROS (vgl. Abb. 6), die unter anderem die Membranbestandteile von Mikroorganismen oxidieren. Zusätzlich wirken ROS auch indirekt zytotoxisch: Superoxide begünstigen durch Alkalisierung des pH-Wertes (Segal et al. 1981; Savina et al. 2006) und durch transmembranösen Elektronentransfer mit konsekutiver Osmolaritätsänderung (Reeves et al. 2002; Ahluwalia et al. 2004; Segal 2005) die Entstehung eines bakteriziden Milieus in Phagosomen. Zusätzlich inaktivieren ROS über das H_2O_2 -MPO-System Virulenzfaktoren (Clark 1986).

Neben der physiologisch zielgerichteten Produktion von ROS durch NADPH-Oxidasen in Abwehrzellen fällt die Mehrzahl der ROS allerdings als Abfallprodukt aus anderen Stoff-

1. Einleitung

wechselprozessen an (vgl. Abb. 6): Die membran-assoziierte Xanthinoxidase (Ullrich und Bachschmid 2000) produziert ROS, allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, welcher Zusammenhang zu Kardiopathologien besteht (Erickson et al 2011a). Zusätzlich werden ROS bei der ATP-Gewinnung in Mitochondrien produziert und können, wenn sie in großem Maße anfallen zu Apoptose und myokardialer Schädigung führen (Sawyer und Colucci 2000; Schrader und Fahimi 2004; Bedard und Krause 2007). Dieser Prozess scheint bei mitochondrialer Modifizierung im Rahmen des myokardialen Remodellings noch weiter begünstigt zu werden und kann Herzinsuffizienz so weiter vorantreiben (Dhalla et al. 2009).

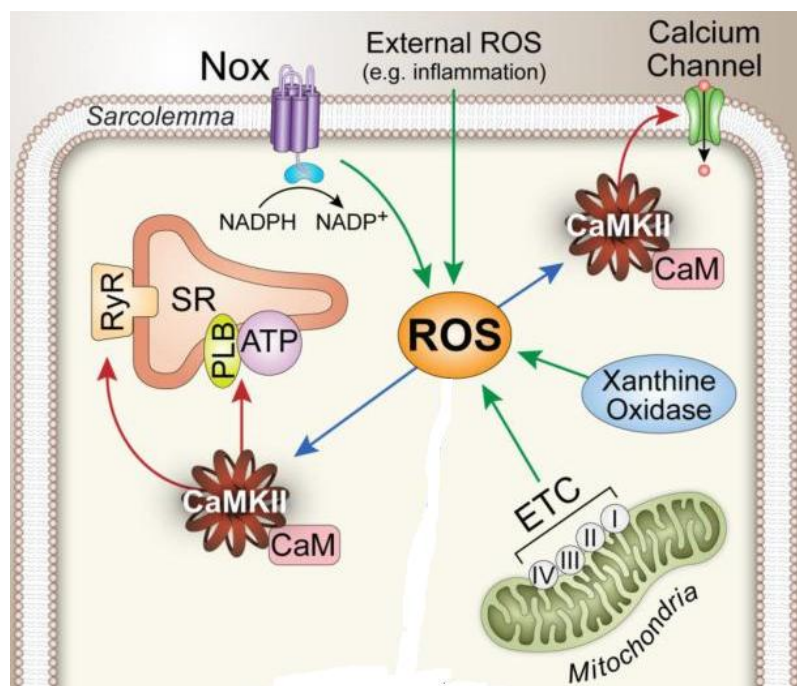


Abbildung 6 ROS-Quellen; modifiziert nach Erickson et al 2011a

Zum Schutz körpereigener Strukturen vor scheinbar überflüssigen Radikalen werden die ROS zumeist in Peroxisomen (Babior 1999) abgebaut: Die Hyperoxid-Dismutase katalysiert die Disproportionierungsreaktion, die Superoxid in H_2O_2 und O_2 umwandelt. Wasserstoffperoxid wird mittels Katalase enzymatisch weiter zu Sauerstoff und Wasser entgiftet (vgl. Abb. 5). Peroxidasen katalysieren ebenfalls Disproportionierungsreaktionen. Zusätzlich nutzt der Organismus körpereigene und extern zugeführte Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin C, Vitamin E und Bilirubin.

Neben den destruirenden Eigenschaften wird den ROS seit kurzem auch eine Rolle als sekundäre Botenstoffe und eine Beteiligung an regulatorischen Prozessen zugesprochen (Thannickal und Fanburg 2000): Sie sind beteiligt an Signaltransduktionen, Zelldifferenzierung und der CaMKII-Aktivierung (Erickson et al. 2011a). Für letzteres scheint vor allem die

1. Einleitung

ANGII-vermittelte ROS-Generierung durch die NAD(P)H-Oxidasen eine Rolle zu spielen (Erickson et al. 2008).

1.4.2 Die Familie der NAD(P)H-Oxidasen (NOX)

Der erste Hinweis auf die Existenz von ROS ergab sich 1933, durch die Entdeckung des sogenannten oxidative burst in aktivierten neutrophilen Granulozyten (Baldridge und Gerard 1932). Als Urheber dieses Phänomens konnten ungefähr dreißig Jahre später die NAD(P)H-Oxidasen identifiziert werden, die mithilfe des Koenzyms NAD(P)H Elektronen über biologische Membranen transportieren und so molekularen Sauerstoff zu Superoxid reduzieren (Rossi und Zatti 1964; Bedard und Krause 2007). Sie sind die einzigen Biokatalysatoren, deren primäre Aufgabe in der Erzeugung von ROS besteht (Selemidis et al. 2008). Aktuell gehören zu der Familie der NADPH-Oxidasen die NOX1-5 und die DUOX 1 und 2. Alle NAD(P)H-Oxidasen bestehen aus sechs hochkonservierten Transmembran-Domänen und besitzen einen zytoplasmatischen COOH-Terminus mit integrierten benachbarten NAD(P)H- und FAD-Bindungsstellen. Des Weiteren befinden sich vier Häm-bindende Histidine in der dritten und fünften, bei den DUOX abweichend in der vierten und sechsten, Transmembranschleife (Bedard und Krause 2007).

Die meisten bisher bekannten Details über die NAD(P)H-Oxidasen entstammen Untersuchungen über die NOX2 (Bedard und Krause 2007), die als einzige Isoform in Kardiomyozyten exprimiert wird (Heymes et al. 2003) und maßgeblich an der ANGII-vermittelten CaMKII-Aktivierung beteiligt zu sein scheint.

1.4.3 Die NAD(P)H-Oxidase 2 (NOX2; gp91^{phox}): molekulare Grundlagen und Aktivierungsmechanismen

Ursprünglich entdeckt in Neutrophilen Granulozyten (Rossi und Zatti 1964) wird die NOX2 auch in vielen anderen Zelltypen exprimiert (Kalsi et al. 1993; Görlach et al. 2000; Cheng et al. 2001; Heymes et al. 2003; Serrano et al. 2003). Allen gemeinsam ist die hochkonservierte, multisegmentale Molekülstruktur: In inaktiviertem Zustand ist die NOX2 ein sechsteiliger Transmembrankomplex mit cytoplasmatischem COOH- und NH₂-Terminus (vgl. Abb. 7) (Bedard und Krause 2007).

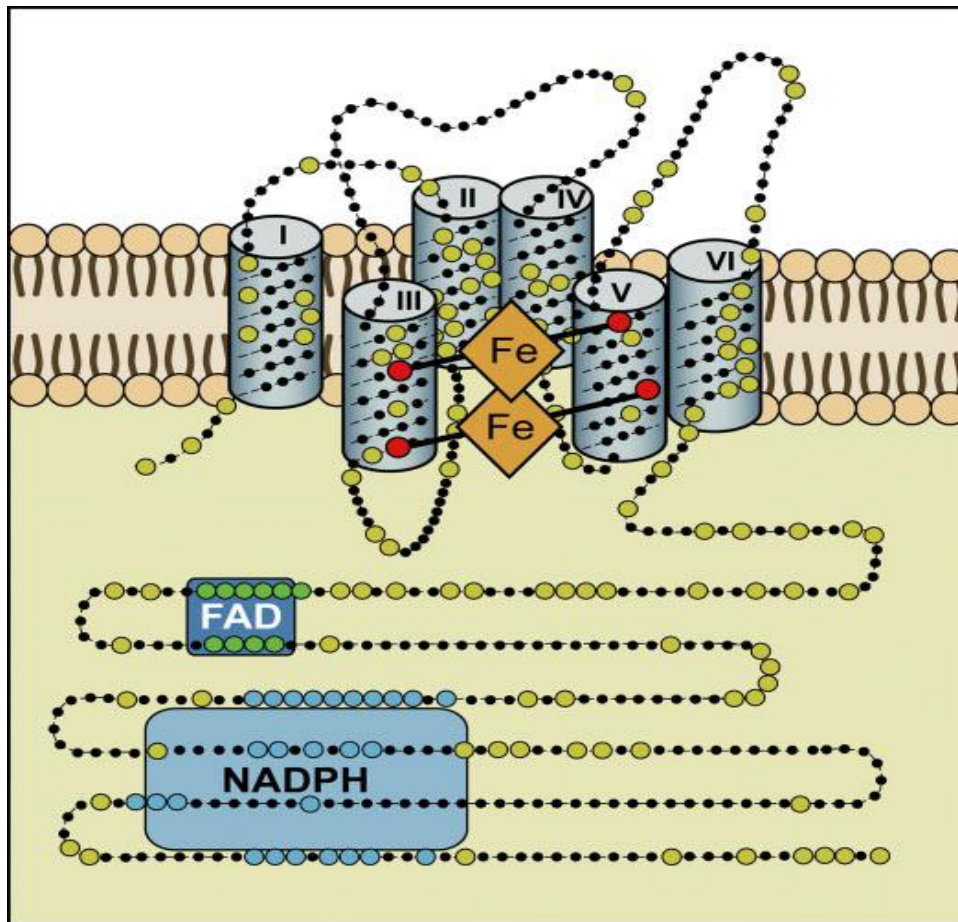


Abbildung 7 Mutmaßliche Molekularstruktur der NOX 2 in Anlehnung an indirekte Daten, bei noch nicht abschließend geklärter Kristallstruktur des Proteinkomplexes (Bedard und Krause 2007). Der Elektronentransfer erfolgt von NAD(P)H ausgehend zu FAD und schließlich über die beiden Häm-Strukturen auf Sauerstoff.

Dieser Transmembrankomplex bildet mit der stabilisierenden Untereinheit $p22^{\text{phox}}$ das sogenannte Flavocytochrome b_{558} (cyt b_{558}) (vgl. Abb. 8A), da beide nur als Heterodimer vor dem Abbau durch zelluläre Proteasomen geschützt sind (DeLeo et al. 2000). Die gegenseitige Abhängigkeit wird durch klinische Beobachtung verdeutlicht, da in Patienten-Phagosomen mit einem $p22^{\text{phox}}$ -Mangel auch NOX2 nicht nachweisbar ist (Parkos et al. 1989; Dinauer et al. 1990). Das cyt b_{558} beinhaltet das in Ruhe gehemmte katalytische Zentrum. Die Enzymaktivierung erfolgt durch vier akzessorische Untereinheiten, die sich im Ruhezustand inaktiv im Zytosol befinden. Dazu zählen die organisatorische Untereinheit $p47^{\text{phox}}$ und die aktivierende Untereinheit $p67^{\text{phox}}$, die mit $p40^{\text{phox}}$ einen Komplex bilden, sowie die kleine GTPase Rac (vgl. Abb. 8A) (Groemping und Rittinger 2005; Hahn et al. 2011). Reguliert wird das interproteinerge Zusammenspiel durch die räumliche Trennung und die Beeinflussung der Autoinhibition mittels posttranslationaler Modulierung der Untereinheiten (Groemping und Rittinger 2005).

1. Einleitung

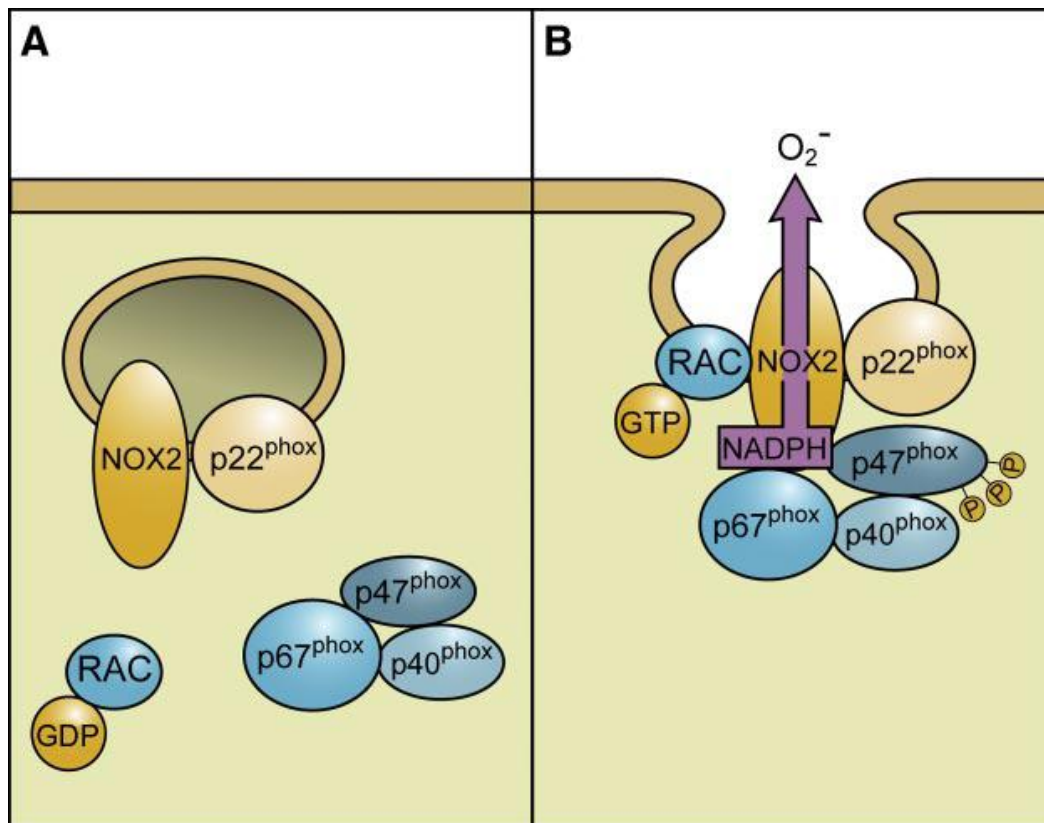


Abbildung 8 Aktivierungsmechanismus der NOX2: A: Vor Aktivierung B: Nach Aktivierung (Bedard und Krause 2007)

Unter Inaktivierung liegen $p67^{\text{phox}}$ und $p40^{\text{phox}}$ getrennt von $p47^{\text{phox}}$ vor. Die beiden ersteren bilden, vor allem bedingt durch die Affinität ihrer jeweiligen PB1-Domänen (Phox and Bem1) (vgl. Abb. 9) zueinander, ein cytosolisches Heterodimer (Ito et al. 2001). Innerhalb besagter PB1-Regionen reagieren die basischen Aminosäuren (Basic Cluster) von $p67^{\text{phox}}$ mit den sauren Aminosäuren (Acidic Cluster) von $p40^{\text{phox}}$ (Kuribayashi et al. 2002; Wilson et al. 2003).

Die Aktivierung erfolgt durch mehrere ineinandergreifende und phosphorylierungsabhängige Schritte, die vor allem die Untereinheit $p47^{\text{phox}}$ betreffen: Nach der initialen Phosphorylierung der Untereinheit $p47^{\text{phox}}$ (Aminosäuren Ser³⁵⁹ und S³⁷⁰ (Johnson et al. 1998; Groemping und Rittinger 2005)) bildet diese ein Heterodimer mit $p67^{\text{phox}}$ (vgl. Abb. 8A). Das Heterodimer wird zusätzlich stabilisiert durch eine Bindung zwischen $p40^{\text{phox}}$ (SH3-Domäne; vgl. Abb. 9)) und $p47^{\text{phox}}$ (PRR-Domäne; vgl. Abb. 9)) (Wientjes et al. 1996). Anschließend koordiniert $p47^{\text{phox}}$ die Translokation zur Zellmembran (PX-Domäne bindet an Phosphoinositolverbindungen (Kanai et al. 2001)) und die Anbindung an die C-terminalen PRR-Domäne von $p22^{\text{phox}}$ (Leto et al. 1994; DeLeo et al. 1995; Ago et al. 1999). Durch die resultierende räumliche Nähe kann die aktivierende Untereinheit $p67^{\text{phox}}$ den transmembranösen Elektronentransfer katalysieren. Die kleine GTPase Rac wird in Ruhe

1. Einleitung

durch das regulatorische GDI-Protein an GDP gebunden und bleibt so zytosolisch lokalisiert und inaktiv (Regazzi et al. 1992). Externe Stimulation führt über Konformationsänderungen in der switch-I- und switch-II-Region zur GDI-Dissoziation und zum Austausch von GDP durch GTP. Es folgt die membranöse Translokation und die Interaktion mit den anderen Untereinheiten (Heyworth et al. 1994; Gorzalczy et al. 2000). Die genaue Bedeutung der GTPase wird noch diskutiert (Bokoch und Diebold 2002; Bokoch und Knaus 2003). Sie scheint allerdings mit $p67^{\text{phox}}$ zu interagieren und dadurch für die korrekte Positionierung und die Anregung der aktivierenden Untereinheit verantwortlich zu sein (Sarfstien et al. 2004). Nach der Zusammenlagerung zum Heterohexamer (vgl. Abb. 8B) kommt es zur Konformationsänderung mit konsekutiver Aktivierung (Paclet et al. 2000).

Der Elektronentransfer erfolgt katalysiert durch cytb_{558} und $p67^{\text{phox}}$ (Nisimoto et al. 1999) vom C-terminalen Donor NADPH zunächst auf FAD (vgl. Abb. 7). Das reduzierte FADH_2 überträgt daraufhin ein Elektron auf das Eisenzentrum des inneren Häm-Moleküls (vgl. 1.4.2), das, um dieses Elektronen aufnehmen zu können, eines seiner eigenen Elektronen an das äußere Häm abgeben muss. Im Anschluss wird FADH durch Abgabe auch des zweiten Elektrons zu FAD reduziert. Energetische Grundlage dieser Elektronenkette ist die Bindung von Sauerstoff an das äußere Häm, der die eigentlich überschüssigen Elektronen aufnehmen kann. Es entsteht $\text{O}_2^{\cdot -}$ (vgl. Abb. 8B) (Doussière et al. 1996; Vignais 2002; Cross und Segal 2004), das eine Rolle bei der kardialen Signaltransduktion und Physiopathologie spielt.

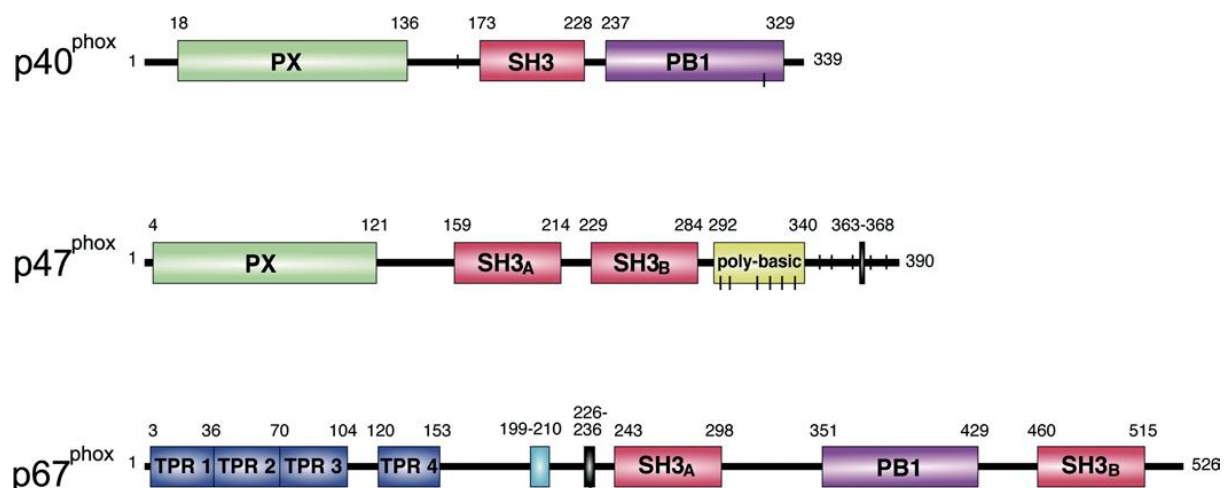


Abbildung 9 Domänen der NOX2-Untereinheiten. Die kleineren schwarzen Querbalken markieren Serin und Threonin, die bei der Aktivierung phosphoryliert werden. Die PB1-Domänen ermöglichen die Heterodimer-Bildung zwischen $p40^{\text{phox}}$ und $p67^{\text{phox}}$. Der Zusammenschluss zum Heterotrimer erfolgt über PX-Motife und SH3-domänen (SMART: Main page) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

1. Einleitung

1.4.4 Das NOX-ROS-System und Kardiopathologien

ROS steigern über die posttranslationale Modifikation von membranösen Ca^{2+} -Kanälen, IP3-Kanälen und RyR2 den extra- (Wang et al. 2004b) und intrazellulären, zytosolischen Kalziumeinstrom (Granados et al. 2006; Yi et al. 2006). Auch eine ROS-konzentrationsabhängige Beeinflussung der Kalzium-Pumpen wurde beobachtet: Niedrige Konzentrationen bewirken eine Aktivitätssteigerung (Adachi et al. 2004), oxidativer Stress hingegen führt zur Sistierung (Biswas et al. 2006; Granados et al. 2006). Außerdem ist eine oxidationsvermittelte CaMKII-Aktivierung (vgl. 1.5.4) direkt mit ANGII-induziertem Zelluntergang und vaskulärer Hypertrophie assoziiert (Erickson et al. 2008; Palomeque et al. 2009; Li et al. 2010).

Die NOX2 ist zudem auch klinisch von Interesse: Statine vermindern durch Störung der Rac-Membran-Assoziation (Bokoch und Prossnitz 1992) die Einwanderung von Monozyten in geschädigtes Gefäßendothel sowie die ROS-abhängige Oxidation von abgelagertem LDL (Mueller et al. 2005; Phaniendra et al. 2015). Die protektiven Statin-Effekte scheinen also zumindest partiell auf einer NOX2-Inhibition zu beruhen (Nakagami et al. 2003; Mital und Liao 2004). Zudem scheint die ACE-Hemmer-Wirkung Folge der Unterbindung der ANGII-bedingten p22^{phox} -, p67^{phox} - und $\text{gp91}^{\text{phox}}$ -Expressions-Steigerung in Gefäßen und Kardiomyozyten zu sein (Mollnau et al. 2002; Rey et al. 2001). Bei Herzinsuffizienz lassen sich in den Kardiomyozyten signifikant erhöhte NOX2-Expressionsmuster finden (Heymes et al. 2003).

1.4.5 Der NOX2-Inhibitor gp91-ds-tat

Die Beteiligung der NOX2 an Kardiopathologien macht NOX2-spezifische Inhibitoren wie gp91-ds-tat interessant. gp91-ds-tat wurde ursprünglich generiert, um die Wechselwirkungen zwischen NOX2 und dem RAAS zu untersuchen. Eine, von der HIV-Hülle abgeleitete, 9-Aminosequenz (aa-tat) wurde an die Untereinheit $\text{gp91}^{\text{phox}}$ gebunden, um so die Interaktion mit der Untereinheiten zu blockieren und die NOX2-Aktivierung zu hemmen. In Mäusen konnte die ROS-Rate bei einer gp91-ds-tat-Konzentration von $50\mu\text{M}$ um 25% gesenkt werden. In Korrelation dazu zeigte sich eine Verminderung hypertoner Blutdruckwerte (Rey et al. 2001). Allerdings ließen sich der ROS-reduzierende Effekt größtenteils in vaskulärem Gewebe mit vor allem NOX1- und NOX4-Enzymen nachweisen, so dass eine absolute NOX2-Spezifität für gp91-ds-tat nur eingeschränkt vorhanden zu sein scheint (Bedard und Krause 2007).

1. Einleitung

1.5 Die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ)

1.5.1 Entdeckung und Klassifizierung

Erstmals beschrieben wurde die CaMK 1978 durch den US-Amerikanischen Neurobiologen Howard Schulman als neuronales intrazelluläres kalzium-calmodulin-abhängiges Phosphorylierungssystem. Schulman vermutete schon damals, aufgrund der Multilokularität, eine ubiquitäre Beteiligung an der intrazellulären Informationsvermittlung (Schulman und Greengard 1978).

Biochemisch gehört die CaMK zu den Proteinkinasen, oder genauer zu den Phosphotransferasen, da sie als Serin-Threonin-Kinase PO_4^{2-} vom Donor ATP auf die Aminosäure-Hydroxygruppen der jeweilige Zielstruktur überträgt (Enzyme Nomenclature; IUBMB Nomenclature Home Page). Diese posttranslationale Modifikation führt zur Entstehung von Phosphorsäureestern die innerhalb des Zielproteins zu Ladungsverschiebungen und Konformationsänderungen führen, wodurch die CaMK die Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst und die zelluläre Signaltransduktion koordiniert (Rassow et al., S. 480; 544-565). Das Spektrum CaMK-abhängiger Regulationsprozesse ist immens und umfasst neben der Regulierung des Energiestoffwechsels, der Ionenkanäle und der Transmittersysteme auch die Mitkoordination nukleärer Transkription und Translation (Hanson und Schulman 1992; Braun und Schulman 1995; Heist und Schulman 1998; Soderling et al. 2001). Grundlage dieses breiten Reaktionsspektrums sind die komplexe multisegmentale Molekülstruktur und die gewebespezifische Expression.

1.5.2 Isoformen, Gewebepreferenzen und Lokalisation

Die Daten über die molekulare Enzymstruktur entstammen größtenteils neuronalen Experimenten, die die CaMK als Mediator von Lern- und Gedächtnisprozessen etabliert haben (Hudmon und Schulman 2002a und 2002b). Allerdings ist die CaMK kein rein neuronales Protein, sondern eine ubiquitäre multifunktionale Serin-Threonin-Kinase.

Die CaMK bildet multimere Holoenzyme aus bis zu 12 Untereinheiten (Kuret und Schulman 1984; Hoelz et al. 2003), die durch vier konservierte Gene codiert und in die vier Isoformen α , β , γ und δ unterteilt werden. Für jede Isoform existieren mehrere Splice-Varianten, wobei die δ -Isoform mit 8 Splice-Varianten die größte Vielfalt aufweist. Hinsichtlich ihrer Verteilung zeigen die Isoformen Gewebepreferenzen: Im ZNS dominieren α und β (Erondur und Kennedy 1985), während Kardiomyozyten vorwiegend die Isoform δ exprimieren (Edman und Schulman 1994). Innerhalb der Herzmuskelzellen ist die δ -Splice-Variante B vornehmlich nukleär

1. Einleitung

und die Variante δ C zytoplasmatisch lokalisiert (Srinivasan et al. 1994). Innerhalb des Zytosols findet sich die CaMKII in Epifluoreszenzmessungen am Mausmodell vor allem an den Z-Linien des Sarkomers wieder (Erickson et al. 2011a). Zusätzlich werden die Enzyme durch posttranslationale Modifikationen noch weiter individualisiert. Zu beachten ist, dass erkrankte Zellen ein verändertes Expressionsverhalten aufweisen (Hoch et al. 1999). Am besten untersucht ist die CaMKII, die in Ihrer δ -Splice-Variante eine entscheidende Rolle in der kardiovaskulären Pathophysiologie spielt (Barany 1995, S. 143, Erickson et al. 2011a). Ergänzend sei erwähnt, dass sich zusätzlich zur CaMKII die CaMK Ia, Ib (DeRemer et al. 1992; Picciotto et al. 1993), III (Nairn et al. 1985), IV (Means et al. 1991) und V (Mochizuki et al. 1993) anhand ihrer Molekülmassen, der Substrat-Spezifitäten und der Aktivierungsmechanismen abgrenzen lassen. Sie sind nach aktuellem Wissensstand allerdings nicht an der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen beteiligt.

1.5.3 Molekülstruktur und Enzymregulation

Die CaMKII fungiert als Sensor, Modulator und Mediator von Kalziumsignalen. Die Grundlage dafür ist die stark ausgeprägte Wechselbeziehung zwischen der Molekülstruktur und der Enzymfunktion: Jede der 12 CaMKII-Untereinheiten ist dreieggliedert in eine N-terminale katalytische, eine autoregulatorische und eine C-terminale assoziative Domäne (vgl. Abb. 10). Über die Assoziationsdomäne erfolgt der Zusammenschluss zum dodekaedrischen Multimer. Die regulatorische Domäne kontrolliert die Enzymaktivität. Die Effektdomäne im N-Terminus interagiert mit den Substraten. Sie besitzt zur Übertragung von PO_4^{2-} eine Donor-Bindungsstelle (ATP) und eine Akzeptor-Bindungsstelle für das Zielprotein (Hudmon und Schulman 2002b; Rellos et al. 2010). Die Enzymsequenzen der katalytischen und autoregulatorischen Region sind mit 89-93% identischer Aminosäuren relativ konserviert. Die Variabilitäten innerhalb der Assoziationsdomäne ermöglicht die Kombination von Untereinheiten verschiedener Isoformen, wobei die Auswirkungen der Interaktionen zwischen Untereinheiten verschiedener Isoformen innerhalb eines Holoenzym noch nicht abschließend untersucht sind (Hudmon und Schulman 2002b).

1. Einleitung

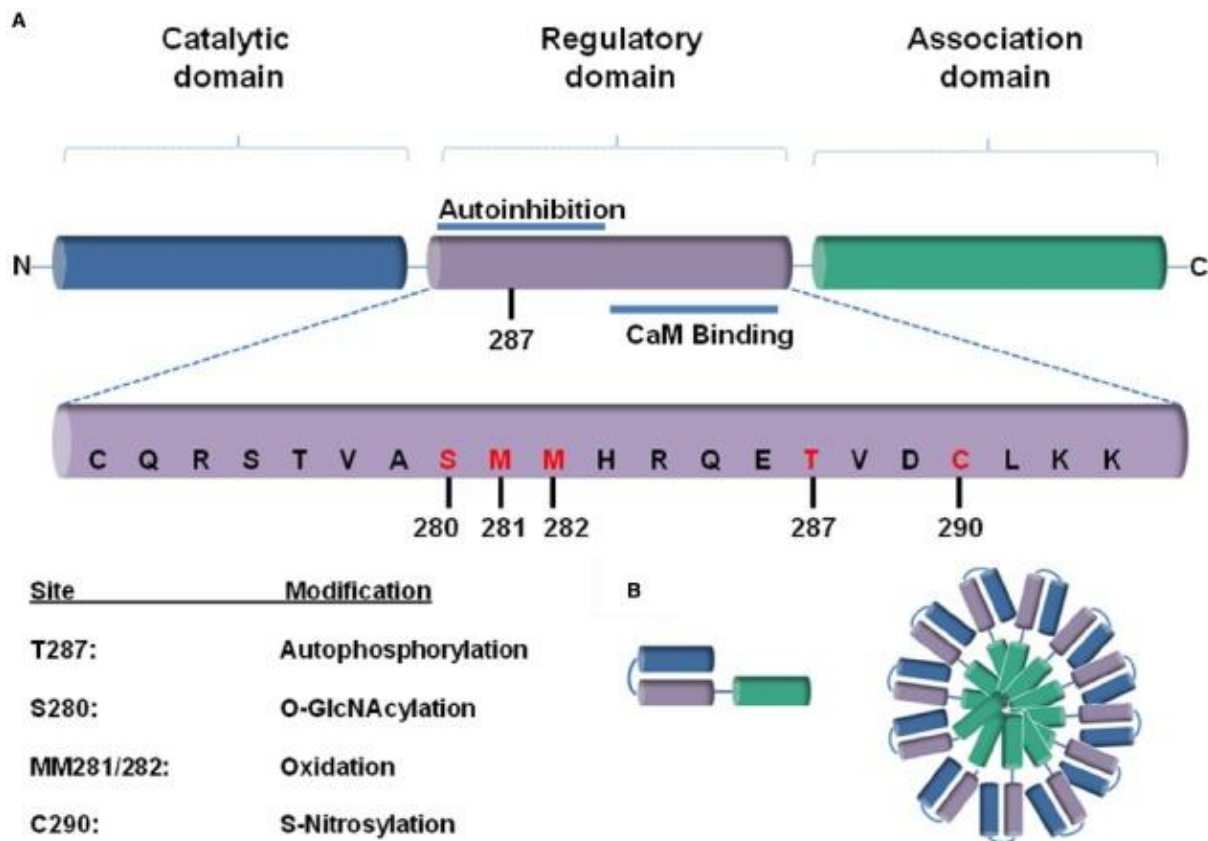


Abbildung 10 Schematische Darstellung der CaMKII-Untereinheit (Mollova et al. 2015).

Der komplexe Aufbau der CaMKII ermöglicht, vereinfacht ausgedrückt, drei Funktionszustände: Den inaktiven Ruhezustand, die basale Ca^{2+} /CaM-abhängige Enzymaktivität und die autonome Aktivität.

Unter Ruhebedingungen werden die beiden Bindungsstellen der katalytischen Region intraenzymatisch durch den als Pseudosubstrat agierenden N-terminalen Anteil der benachbarten autoregulatorischen Domäne gehemmt (vgl. Abb. 11), wodurch das katalytische Potential um das 100- bis 1000-fache gesenkt wird (Kemp et al. 1994). Diese Hemmung kann je nach Isoform kompetitiver und/oder allosterischer Natur sein (Hudmon und Schulman 2002b). Steigt die Kalziumkonzentration bilden sich Ca^{2+} /CaM-Komplexe, die an die autoregulatorische Domäne binden (K_D 10-70 nM (Gaertner et al. 2004)) und über Ladungsverschiebungen eine Konformationsänderung mit konsekutiver Loslösung von der katalytischen Domäne bewirken (Rellos et al. 2010). Dabei ist das Aktivitätsausmaß von der Kalziumkonzentration (halbmaximale Aktivität ab $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ (Rostas und Dunkley 1992) und von der lokalen ATP-Konzentration abhängig. Unter Anwesenheit von ATP bildet die CaMKII eine maximal komprimierte 3D-Struktur, die durch große räumliche Nähe vermutlich intraenzymatische Phosphorylierung begünstigt (Katoh und Fujisawa 1991; Meyer et al. 1992; Sugiura und Yamauchi 1993; Török et al. 2001). Die Ca^{2+} /CaM-vermittelte Freilegung der katalyti-

1. Einleitung

schen Domäne ist der initiale Aktivierungsschritt, der der autonomen Aktivität vorausgehen muss.

1.5.4 Die Aktivierungswege der CaMKII

Die initiale CaMKII-Aktivierung wird durch Aufhebung der intraenzymatischen Autoinhibition via Konformationsänderung der autoregulatorischen Domäne vermittelt. In Folge der Strukturänderung büßt diese ihre Funktion als blockierendes Pseudosubstrat ein. Auslöser ist die Ca^{2+} /CaM-Anbindung an die regulatorische Domäne der einzelnen Untereinheiten mit konsekutiver maximaler Enzymaktivität (Lee und Edelman 1995). Nach Dissoziation des Ca^{2+} /CaM-Komplexes geht die CaMKII erneut in den Ruhezustand über (Rostas und Dunkley 1992; Hudmon und Schulman 2002b). Neben dieser Grundaktivität existieren zwei weitere Aktivierungswege, die durch posttranslationale Modifikation eine Ca^{2+} /CaM-unabhängige CaMKII-Aktivität ermöglichen. Die betreffenden Signalwege führen RAAS- und β -adrenerg vermittelt zur Enzymoxidation bzw. zur Phosphorylierung (vgl. Abb. 11).

Der Zusammenhang zwischen β -adrenergen Signalen und autonomer CaMKII-Aktivität wurde erstmals 1997 beschrieben (Baltas et al. 1997). Der Sympathikus erhöht über β_1 -vermittelte (vgl. 1.2.4 und 1.3.4) Phosphorylierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und RyR2 die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Dabei ist zu beachten, dass kurze Signale primär zu einer PKA-Aktivierung führen und erst länger anhaltende die CaMKII beeinflussen (Wang et al. 2004a): Prolongierte oder sich in kurzen Abständen wiederholende Kalziumsignale führen bei entsprechender ATP-Konzentration zu wechselseitiger Autophosphorylierung der Untereinheiten innerhalb der autoregulatorischen Domäne, entweder an dem Aminosäurest Threonin 286/287 oder im Bereich der Ca^{2+} /CaM-Bindungsstelle. Die konsekutiven Konformationsänderungen der autoregulatorischen Domäne haben mehrere Auswirkungen: Die Affinität für Ca^{2+} /CaM erfährt eine 1000-fache Steigerung (CaM-Trapping) (Meyer et al. 1992). Die Phosphorylierung der CaM-Bindungsstelle im bereits aktivierten Enzym verhindert eine erneute CaM-Anbindung (CaM-Capping). Die Phosphorylierung von Threonin 286/287 verhindert die Re-Assoziation zwischen katalytischer und autoregulatorischer Domäne und ermöglicht anhaltende autonome Enzymaktivität (vgl. Abb. 10). Threonin 286/287 ist Bestandteil des inhibitorischen Bereiches der Autoregulationsdomäne. Es interagiert im Ruhezustand mit der katalytischen Domäne und ist in eine hydrophobische Tasche eingebettet und damit unzugänglich für äußere Interventionen (Fong et al. 1989; Waldmann et al. 1990). Erst die unter Anbindung von Ca^{2+} /CaM stattfindende Konformationsänderung macht es für intraenzymatische Beeinflussung zugänglich (Yang und Schulman 1999). Im Ruhezustand scheint Threo-

1. Einleitung

in 286/287 gemäß seiner Lokalisation eine autoinhibierende Funktion auszuüben, da die Umwandlung von Threonin 286/287 in eine hydrophile Aminosäure eine spontane Zunahme der katalytischen Enzymaktivität bewirkt, während die in andere hydrophobe Aminosäuren folgenlos bleibt (Fong et al. 1989; Waldmann et al. 1990; Yang und Schulman 1999).

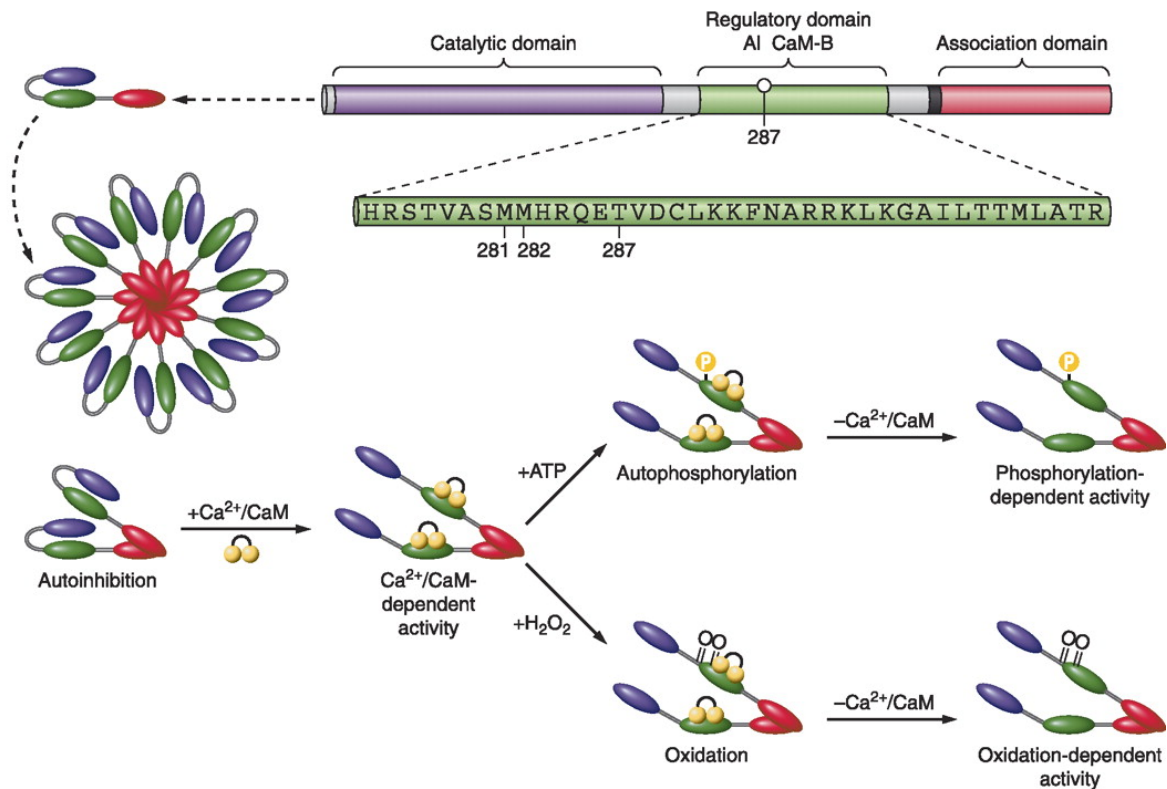


Abbildung 11 Molekularstruktur und Reaktionsmechanismen der CaMKII (Erickson et al. 2011a)

Die Rückkehr in den Ruhezustand erfolgt durch Phosphatase vermittelte Dephosphorylierung (Strack et al. 1997).

Neben diesem seit längerem bekannten Mechanismus konnte 2008 ein oxidationsabhängiger Aktivierungsweg beschrieben werden (Erickson et al. 2008). Nach RAAS-Aktivierung (vgl. 1.3.5) führt ANGII über membranständige AT1-Rezeptoren und die NOX2 zur Generierung von ROS (vgl. 1.4). Diese oxidieren redox-sensible Aminosäuren in der autoregulatorischen Domäne und führen so zu einer Konformationsänderung, die, wie bei der Autophosphorylierung, die Interaktion zwischen katalytischer und autoregulatorischer Domäne unabhängig von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ verhindert, mit dem Resultat der autonomen Aktivität (vgl. Abb. 11) (Rellos et al. 2010). Es handelt sich bei den Aminosäuren um Methionin und Cystein, die als einzige Aminosäuren Schwefel enthalten. Ihre Thioether- bzw. Thiolgruppen können kovalente Bindungen eingehen. Die ROS-vermittelte CaMKII-Oxidation (ox-CaMKII) erfolgt je nach Isoform an unterschiedlichen Aminosäuren (α C^{280/281}; β , γ , δ M^{281/82}) und kann, im Fall der CaMKII,

1. Einleitung

durch die sogenannte Methionin Suloxid Reduktase A (MsrA) wieder aufgehoben werden, so dass eine Rückkehr in den inaktiven Ruhezustand möglich ist. Eine potentielle gegenseitige Beeinflussung der beiden autonomen Aktivierungswege (Oxidation vs. Phosphorylierung) ist derzeit noch Gegenstand von Experimenten und Diskussionen (Erickson et al. 2008; Rellos et al. 2010; Erickson 2014).

Neben dem Aktivierungsweg spielen auch die Kalziumtransienten eine Rolle. In neonatalen Kardiomyozyten der Ratte zeigten sich im Rahmen der Initiierung kardialer Hypertrophien erhöhte Kalziumtransienten. Diese gingen mit einer gesteigerten CaMKII-Aktivität und einer Translokation einher. Im Anfangsstadium konnte lediglich ein Zytoplasma-Nukleus-Shift von CaM, in den späteren Phasen auch eine Translokation der CaMKII in den Nukleus detektiert werden (Gangopadhyay und Ikemoto 2010).

1. Einleitung

1.6 Ziele der vorgelegten Arbeit

Die prognostisch günstige Wirkung von ACE-Hemmern, β -Blockern und Aldosteron-Antagonisten bei Patienten mit Herzinsuffizienz bekräftigt die These, dass vor allem eine chronische, inadäquate Sympathikus- und RAAS-Aktivierung zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Herzpathologien, insbesondere der Herzinsuffizienz, beitragen (Grimm und Brown 2010). Aktuelle Untersuchungen implizieren, dass die pathogenen Auswirkungen über eine Steigerung der CaMKII-Expression/-Aktivität vermittelt werden (Zhang et al. 2003), wobei genaue Details noch weitestgehend unbekannt sind. Um die CaMKII zukünftig als Therapie-Target nutzen zu können, sind Kenntnisse über das CaMK-Aktivierungsverhalten und die Signalwegsinteraktionen (vgl. 1.5.4) unerlässlich (Erickson et al. 2011a). Das Ziel dieser Arbeit ist es, detaillierte Kenntnisse über das mikromolekulare Reaktionsverhalten und die Reaktionskinetik der im Herzmuskel vornehmlich exprimierten CaMKII δ zu gewinnen. Schwerpunktmäßig wurden die Auswirkungen der Autophosphorylierungsstelle Threonin 286/287 (T286/287) auf die Enzymaktivität untersucht.

Zur bioanalytischen Darstellung und Quantifizierung von Reaktionsverhalten und -kinetik wurden ein geeignetes bildgebendes Verfahren, ein geeigneter Biosensor zur real time Visualisierung sowie der geeignete Vektor und ein geeignetes Tiermodell gesucht. Zusätzlich wurden zur Generierung aussagekräftiger Daten eine möglichst hohe Zellqualität und -quantität sowie eine ausreichende Zellfluoreszenz angestrebt. Die Epifluoreszenzmikroskopie wurde aufgrund ihrer guten zeitlichen und räumlichen Auflösung sowie der Möglichkeit der in vivo-Messung ausgewählt. Als Biosensor wurde Camui α als adenovirales Vehikel genutzt, da seine Threonin 286 deletierte Version die Eliminierung der Autophosphorylierung erlaubt. Aufgrund der für den Versuchserfolg notwendigen hohen Zellqualität und -quantität wurden zur Wahl des Tiermodells Vor-Experimente durchgeführt, die zur Nutzung eines Ratten-Modells führten. Zusätzlich waren die Bestimmung der idealen MOI zur Optimierung der Virustoxizität und Zellfluoreszenz notwendig (vgl. 3.2).

Zur Visualisierung der einzelnen Aktivierungswege und ihrer gegenseitigen Wechselwirkung waren Stimuli notwendig, mit denen die RAAS- und β -adrenerg vermittelte Enzymaktivierung sowie die autonome Aktivität unter Autophosphorylierung und nach Oxidation nachgebildet werden konnten. Es wurden fünf zum Teil aufeinander aufbauende Versuchsreihen mit verschiedenen Stimulationsmodellen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Einführung in den Versuchsalgorithmus

Schwerpunkt der Versuchsreihen ist die Bedeutung der Autophosphorylierung für die Reaktionskinetik und –dynamik der CaMKII δ . Zu diesem Zweck wurde die Enzymaktivität unter Verwendung des Biosensors Ad-Camui α epifluoreszenzmikroskopisch gemessen. Die Methode erlaubt eine dynamische in-vivo-Darstellung und Quantifizierung der konformationsabhängigen CaMKII-Aktivität als Fluoreszenzsignal (Börner et al. 2011).

Initial wurden adulte Ratten-Kardiomyozyten isoliert und anschließend durch adenovirale Genstransduktion und Kultivierung die Expression eines CFP-YFP-CaMKII-Fusionsproteins in den Zielzellen erreicht. Anschließend wurden die Zellen mittels elektrischer Feldstimulation zur Verkürzung angeregt und vermessen. Entscheidend für die Generierung adäquater Ergebnisse waren Isolation und Kultivierung um eine höchstmögliche Qualität der Versuchszellpopulation zu garantieren.

2.2. Isolation von Kardiomyozyten der adulten Ratte

Die genutzten Versuchstiere wurden ausschließlich aus der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen rekrutiert. Es handelte sich ausnahmslos um männliche Wildtyp-Ratten (Wistar-Ratten) im Alter zwischen 1,5 und 3 Monaten mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 300 g. Alle Versuchsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und nach Sicherheitsstandards gemäß GenTSV durchgeführt (BAUA/ ABAS, 2012). Die genutzte Isolationstechnik basiert auf der Methode nach Langendorff (Langendorff 1895). Die Tötung der Versuchsratten wurde gemäß §4 und §7a des Tierschutzgesetzes mittels zervikaler Dislokation unter Betäubung mit Isofluran durchgeführt (§§ 4 I, III, 7a I, II TierSchG), aufgrund der geringeren Myokardischämie-Tendenz gegenüber intravenösen Narkoseverfahren (O’Connell et al. 2007). In das noch schlagende Herz wurden 5 ml Heparin (50U/ml) zur Vermeidung von Blutkoageln injiziert (Wolska und Solaro 1996; Cerbai et al. 2000). Die Aorta wurde möglichst weit kranial abgetrennt (Louch et al. 2011), unter mikroskopischer Sicht kanüliert (vgl. Abb. 12A/C) und im Versuchsetting fixiert (vgl. Abb. 12D). Zur suffizienten und homogenen Myokardperfusion wurde auf eine Kanülen-Positionierung oberhalb der Koronarien (vgl. Abb. 12B) geachtet (Langendorff 1895; Louch et al. 2011). Die retrograde Herz-Perfusion via Aorta und Koronarien erfolgte pumpengestützt (konstante Flussgeschwindigkeit 8 ml/min.) in einem mittels Folie abgeschlossen Becherglas mit 37°C

2. Material und Methoden

Umgebungstemperatur. Initial wurde mit kalziumfreier Tyrode perfundiert (vgl. Tabelle 1), um interzelluläre Verbindungen am Glanzstreifen aufzubrechen (Muir 1967). Wegen der drohenden Glykokalyx-Ablösung mit konsekutivem Kalzium-Paradoxon (vgl. 1.3.2) war dieser Schritt auf maximal 5 Minuten begrenzt (Zimmerman et al. 1967; Crevey et al. 1978; Frank et al. 1982). Das sich anschließende Digestionsintervall (vgl. Tabelle 1 Digestionspuffer) variierte je nach Myokard-Beschaffenheit (10-20min.). Ausreichend *weiche* Gewebekonsistenz und verminderte Flussrate waren Marker für adäquate Zersetzung der extrazellulären Matrix, so dass die ventrikulären Herz-Anteile in Enzymlösung überführt und schonend mittels Schere zerkleinert wurden. Die gewonnene Suspension wurde durch ein Polyamid-Siebgewebe (Maschenweite 200µm) filtriert und der Verdau mittels Stopp-Lösung (vgl. Tabelle 1) beendet.

Es folgte ein 8-minütiges Intervall mit graviditärer Pellet-Bildung. Auf zentrifugationsgestützte Sedimentierung wurde zur Reduktion mechanischer Irritationen verzichtet. Nach dem Absaugen des Überstandes folgte der Kalziumaufbau zur Wiederadaptierung an physiologische Kalziumkonzentrationen (Wolska und Solaro 1996; Louch et al. 2011). In vier aufeinanderfolgenden Schritten wurden die sedimentierten Zellen mit 8-10ml kalziumhaltiger Tyrode in aufsteigender Konzentration (0,1mM, 0,2mM, 0,4mM, 0,8mM) resuspendiert. Das Pellet wurde im Anschluss mit 5-10 ml des Kulturmediums M199 wieder in Lösung gebracht. Die Zugabe von 2,3-Butanedionmonoxim (BDM; 50xStock) verhinderte übermäßige Zellkontraktur. Aufgrund variabler Isolationsausbeuten war eine lichtmikroskopische Quantifizierung mittels Hämozytometer (ROTH; T 729.1; Cell Counting with Neubauer Chamber) obligat. Zudem diente die Zellmorphologie als Gütekriterium (vgl. 3.2.3).

Alle verwendeten Lösungen wurden in zweifach destilliertem Wasser gelöst, bei Raumtemperatur auf einen pH-Wert von 7,54 eingestellt (entspricht pH-Wert von 7,4 bei 37°C) und bei 4°C gelagert. Die Reagenzien wurden innerhalb einer Woche nach ihrer Herstellung verwendet. Alle Lösungen wurden steril filtriert (Steriflip/Vacuum Filtration System with Millipore Express PLUS Membrane (0,22µm)) und die Behälteröffnung vor jedem Gebrauch mittels Abflämmung dekontaminiert. Die Anwendung auf vitale Kardiomyozyten erfolgte nach Erwärmung der Versuchsmedien auf 37°C im Wasserbad.

2. Material und Methoden

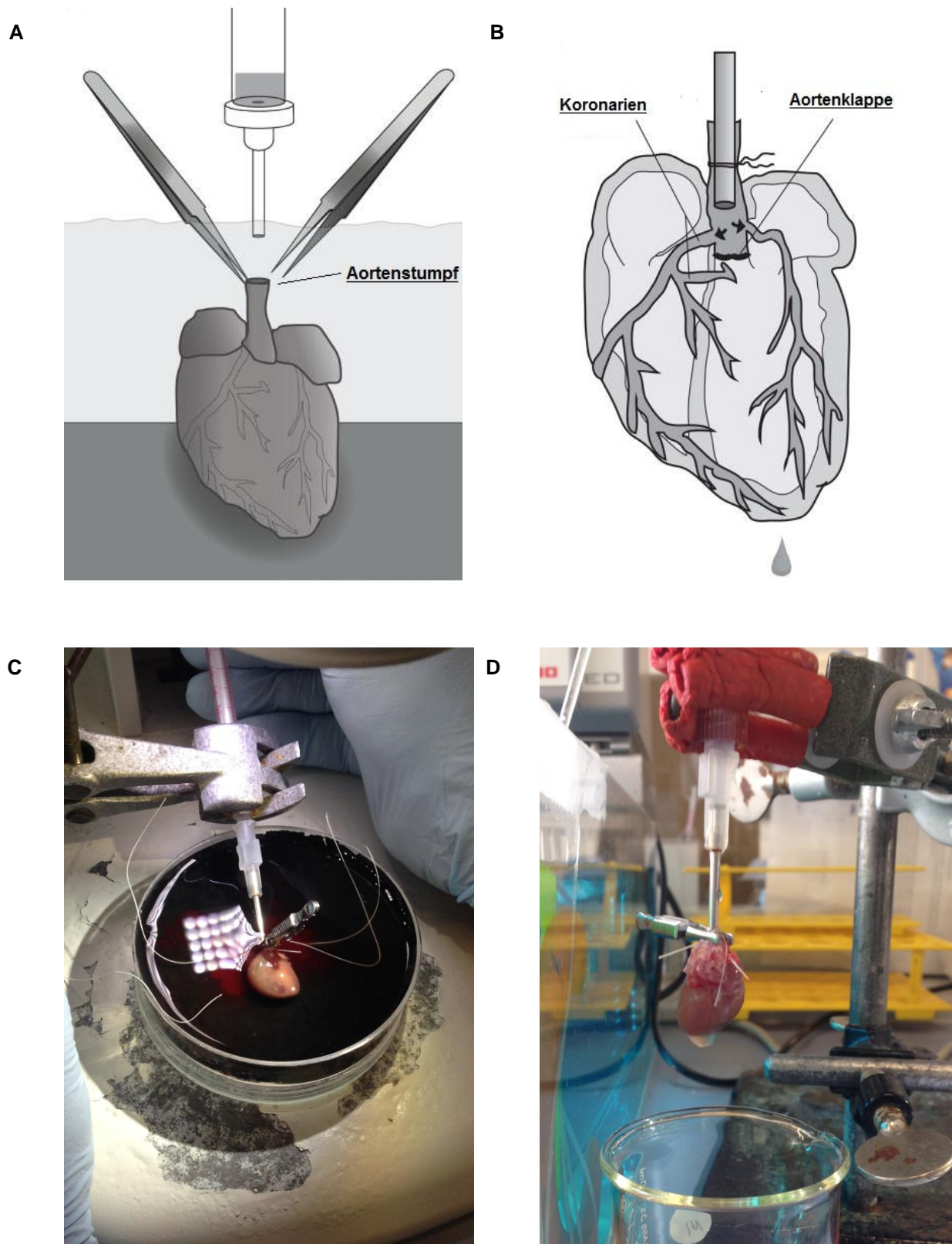


Abbildung 12 A: Kanülierung des Aortenstumpfes am isolierten Herz B: Koronarperfusion(A+B modifiziert nach Louch et al. 2011) C: Kanülierung des Rattenherzens D: Befestigung im Versuchssetting (C+D eigene Fotos).

2. Material und Methoden

Reagenzien	Substanzen	[]
Tyrode (ohne Kalzium; gelöst in ddH ₂ O)	KCl	5,4 mmol/l
	NaCl	137 mmol/l
	MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2 mmol/l
	NaH ₂ PO ₄ *12H ₂ O	1,2 mmol/l
	HEPES	20 mmol/l
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	0.02 mmol/l
	Glucose	14.98 mmol/l
Digestionspuffer (pH 7.4)	Kollagenase Typ II (Biochrom #C2-22)	100 mg/dl
	Taurin	60 mmol/l
	DL-Glutaminsäure	8 mmol/l
	DL-Carnitine	2 mmol/l
	Protease XIV	2.1 mg/dl
	CaCl ₂	1 mmol/l
Stopp-Lösung (Albumin 2%; pH 7.4)	CaCl ₂	0.05 mmol/l
	Albumin Fraktion V	200 mg/dl
	2,3-Butanedionmonoxim	20 mmol/l
Kulturmedium M199 (gelöst in M199 Medium)	Taurin	5 mmol/l
	D,L-Carnitine	5 mmol/l
	Penicillin	100 U/ml
	.Streptomycin	0.02 mmol/l
	L-Glutamin	2 mmol/l

Tabelle 1 Isolations- und Kultivierungsmedien

2.3. Viraler Gentransfer in Eukaryonten

2.3.1 Grundlagen des Gentransfers und der Adenoviren

Bei den Techniken des Gentransfers wird, zum Teil transgen veränderndes, DNA-/RNA-Fremdmaterial in Wirtszellen eingeschleust und in diesen exprimiert (Madigan 2005). Als Vektoren nutzt man dabei unter anderem unbehüllte Adenoviren (Ad), deren Namensgebung auf der erstmaligen Isolation des Virus aus adenoidem Gewebe der Rachenmandeln durch den Virologen W.P. Rowe im Jahr 1953 beruht (Rowe et al. 1953). Aufgrund ihrer evolutionären Rolle als intrazelluläre Parasiten eignet sich ihr Infektionszyklus (vgl. Abb. 13) hervorragend für zelluläre Gentransferprozesse (Kochanek 2001).

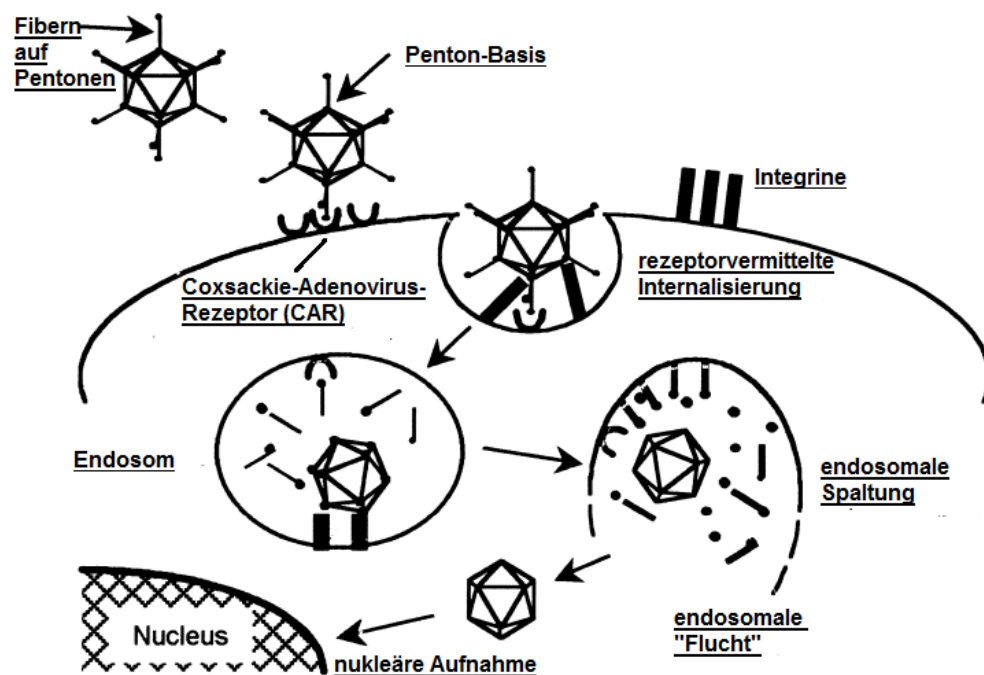


Abbildung 13 Adenoviraler Infektionszyklus. Modifiziert nach (Reynolds und Curiel 2002).

Der Infektionszyklus beginnt mit der Endozytose über den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Das Virus wird entpackt (Uncoating) und diffundiert nach der "Flucht" aus dem Endosom zum Zellkern, wo es sich durch Interaktion des Kapsids mit der Kernmembran in den Nukleus schleust. Die Replikation startet mit der Expressierung der frühen Gene E_1 - E_4 , die unter anderem für die virale DNA-Polymerase kodieren. Die späten Virus-Promotoren initiieren die Bildung von viralen Strukturproteinen. Nach ca. drei Tagen lysiert die Wirtszelle und gibt ca. 1000-10.000 Virusmoleküle frei (Kochanek 2001). Experimentell verwendet man replikationsunfähige, E_1 - und gegebenenfalls zusätzlich E_3 -deletierte Vektoren, die in E_1 beinhaltenen Helferzelllinien wie *E. coli* BJ5183 recBCsbcBC (Hanahan 1983) vermehrt werden müssen: Das Ad-Genom wird mit einem Rekombinationsplasmid auf die Helferzellen

2. Material und Methoden

übertragen (Metzger 2002), die noch vorhandenen späten Gene initiieren die Verpackung der DNA und die rekombinanten Ad-Viren werden von der Helferzelllinie abgegeben (Graham et al. 1977; Fallaux et al. 1996; Louis et al. 1997). Unter Abwägung aller Vor- und Nachteile (Sakoda et al. 1999; Thomas et al. 2003; Djurovic et al. 2004; Rissanen und Ylä-Herttuala 2007; Vinge et al. 2008; Louch et al. 2011) wurde in diesem Setting ein Vektor der Adenovirus Typ 5 Gruppe als Transduktionswerkzeug genutzt. Zur Vermehrung wurden HEK-293-Zellen genutzt (vgl. 2.3.4).

2.3.2 Der Biosensor Ad-Camuia

Ad-Camuia (vgl. Abb. 15) ist ein CFP-YFP-gekoppelter Sensor der die Visualisierung und Quantifizierung des konformationsabhängigen CaMKII-Aktivierungsstatus erlaubt. Ursprünglich 2005 zur Darstellung der CaMKII-Aktivität in Neuronen konzipiert (Takao et al. 2005), findet er seitdem vielfältige Anwendung (Kwok et al. 2008). Die Arbeitsgruppe Donald M. Bers (Department of Pharmacology, University of California Davis, Davis, USA) generierte, basierend auf der vorhandenen Wildtyp-Variante (WT), Threonin286-(T2A) und Methionin281/82-Mutanten, in denen Threonin286/7 gegen Alanin und Methionin281/282 gegen Valin ausgetauscht wurden. Dadurch werden die Phosphorylierung und die Oxidation innerhalb der regulatorischen CaMKII-Domäne unterbunden (vgl. Abb. 14).

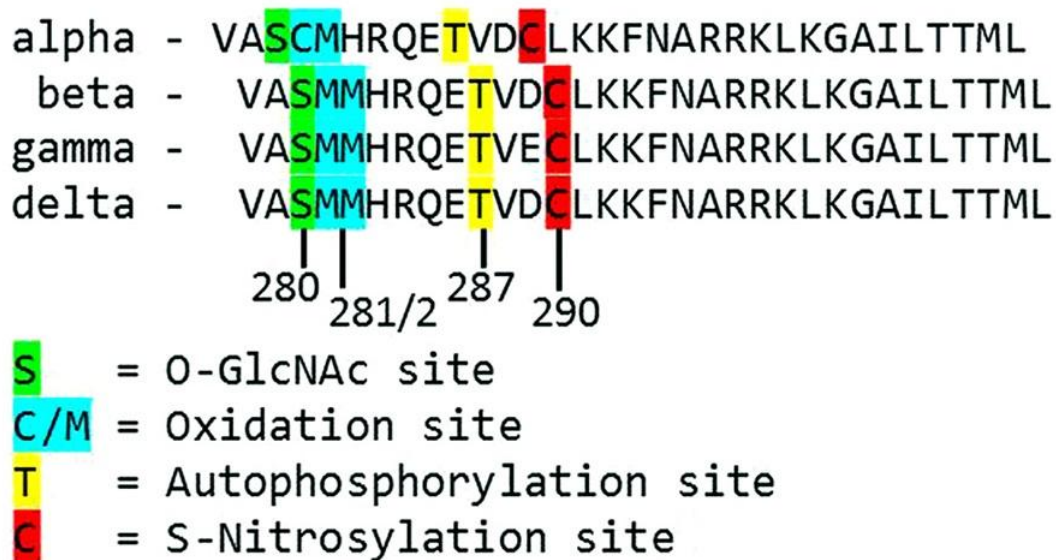


Abbildung 14 Aminosäure-Abfolgen innerhalb der regulatorischen CaMKII-Domäne für die Isoformen α , β , γ und δ . Methionin 281/282 sind blau markiert. Threonin287 ist gelb markiert. (Erickson 2014)

2. Material und Methoden

Von der Arbeitsgruppe Bers wurden die Biosensoren (WT, T2A) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Effektivität des Sensors konnte in mehreren Versuchsreihen erfolgreich nachgewiesen werden (Erickson et al. 2011b). Die Integration des Camui-Konstrukts in den Ad-Vektor erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Systems AdEasy adenoviral vector system (Qbiogene, Inc, Carlsbad, CA).

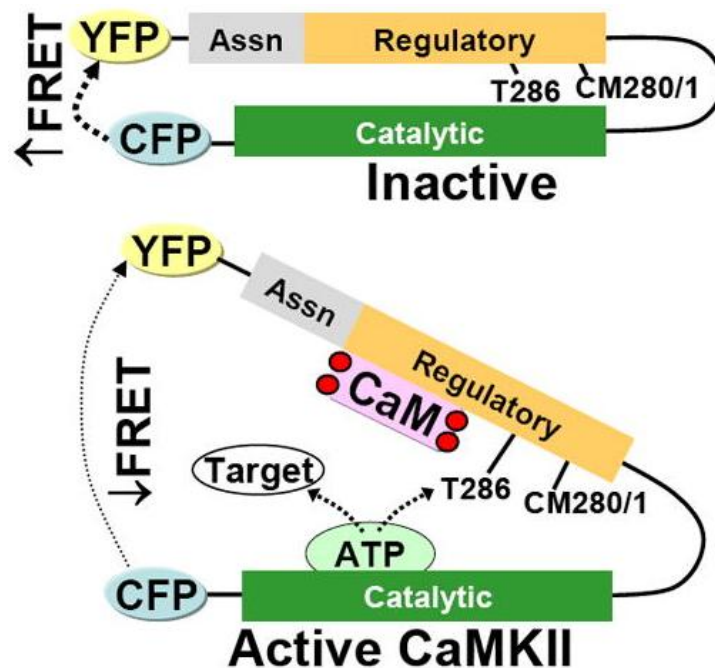


Abbildung 15 Adenoviraler Biosensor Ad-Camui α (Erickson et al. 2011b)

Die Mutante T2A wurde unter Verwendung des QuickChange site-directed mutagenesis Kits (Stratagene) erzeugt (Erickson et al. 2011b). Nach der Vermehrung der Vektoren wurde die Viruskonzentration mittels Extinktion bei 260nm prolongiert gemessen (vgl. Tabelle 2). Zur Quantifizierung wurde außerdem ein Plaque-Assay erstellt und die Konzentration in pfu/ml (plaque forming units/ml) angegeben (vgl. Tabelle 2).

Die Affinität des Biosensors für das Zielmolekül ist sehr variable und unter anderem abhängig von der MOI (Multiplicity of infection; quantitatives Verhältnis der Viruspartikel zu den Zielzellen) und der Versuchszell-Qualität (Bömer et al. 2011).

Virus	Extinktion bei 260nm	Physikal. Virus Konz. (pfu/ml)	Biologische Virus Aktivität (pfu/ml)
Camui α WT	0.224	2.24×10^{11}	$4,37 \times 10^{10}$
Camui α T2A	0.122	1.22×10^{11}	1.77×10^{10}

Tabelle 2 Extinktionen und Konzentrationen von Ad-Camui α

2. Material und Methoden

2.3.4 Viruspräparation

Da Ad-Camui α E1-deletiert bzw. replikationsunfähig ist, erfolgte die Vervielfältigung in A-293-HEK-Zellen (Invitrogen #R705-07) (Graham und Prevec 1991). Dabei handelt es sich um menschliche, embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney*). Die Durchführung erfolgte nach Sicherheitsstandards gemäß GenTSV und unter sterilen Bedingungen. Die genutzten Reagenzien und Chemikalien sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt. Die Anzucht der 293A-HEK-Wirtszellen und die Virus-Vervielfältigung erfolgten parallel:

Die 293A-HEK-Zellsuspension wurde in Kulturflaschen (Tissue Culture Flask 175cm², Sarstedt, #83.1812.002) ausplattiert und bei einer Konfluenz von ca. 70%, mittels 10ml PBS und 3ml Trypsin-EDTA-Solution abgelöst. Nach Auffüllung auf 30ml mit PBS (*phosphate buffered saline*) wurden die Zellen für 5 Minuten bei 800rpm (entspricht bei 75 mm Radium ca. 50 g) zentrifugiert und das Pellet mit DMEM-Medium (Biochrom #F0445) resuspendiert. Die auf ca. 450 ml aufgefüllte Zellsuspension wurde anschließend gleichmäßig auf 30x15cm-Schalen verteilt und erneut für ca. 4 Tage im Wärmeschrank inkubiert.

Für die Virusgenerierung wurde zunächst eine kleine 293A-HEK-Zellpopulation infiziert, um Viruspartikel für die spätere Infektion größerer Zellkulturen zu gewinnen. Es erfolgte die Ausplattierung mit 8,5ml DMEM-Medium und 1,5ml gelöster Zellen, 2 Tage später die Inkubation mit 2-5 μ l Virus-Lösung für 2,5 Stunden und nach 3-5 weiteren Tagen das Abspülen der vollständig lysierten Zellen, die mit ihrem Überstand wie oben beschrieben zentrifugiert wurden. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und wieder Auftauen im Wasserbad. Das Pellet wurde resuspendiert, erneut zentrifugiert und die entstandenen Viruspartikel zur Infizierung größerer Populationen genutzt: 293A-HEK-Wirtszellen wurden mit Iscove Basal Medium (5% FCS (*fetal calf serum*), 1% Anti-Anti (Antibiotic-Antimycotic)) gewaschen und mit 2ml Virusüberstand für 2,5 Stunden inkubiert. Drei Tage später wurde der Überstand der lysierten HEK-Zellen abgespült, zentrifugiert und gleichmäßig auf 30x15cm Zellkulturschalen verteilt. Die Inkubation erfolgte für ca. 2 Stunden bei 37°C mit einer MOI von 100 pfu/Zelle und führte innerhalb von 3 Tagen zur vollständigen Lyse.

Der Überstand wurde abgespült, mit 20% NP-40 (Nonylphenoxy Polyethoxylethanol)/ PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) auf eine Endkonzentration von 0,1% (1:200) verdünnt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rüttelbrett geschüttelt. Es folgten 25 Minuten Zentrifugation bei 4°C (11000rpm (entspricht bei 75mm Radium ca. 9469g), Rotor SLA 1500, Sorvall) und die Inkubation des mit 20% PEG (Polyethylenglycol) 8000/2,5M NaCl aufgefüllten Überstandes für 4 Stunden. Das Inkubat wurde erneut zentrifugiert, der Über-

2. Material und Methoden

stand verworfen und das Pellet nach Zugabe von 1xPBS (Phosphatgepufferte Salzlösung; pH 8.0) erneut für 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Gemisch wurde physikalisch (Zentrifugierung 2 Minuten, 2000rpm (entspricht bei 75mm Radius ca. 335g), RT) und chemisch (CsCl-Lösung) aufgetrennt. Nach Ultrazentrifugation (40000rpm (entspricht bei 75mm Radius 13416g), 16°C, Rotor TI90, Beckman, decel: slow, Hold) über ca. 12 bis 24 Stunden zeigte sich der CsCl-Gradient mit 5 Banden (von kranial nach kaudal: Zellmembran-Bestandteile, Zellproteine, genomische DNA, leeren Virushüllen und Virusbande (Jager et al. 2009)). Die Virusbande wurde über ca. 24-48 Stunden bei 4°C über eine Membran dialysiert. Die Bestimmung der Viruskonzentration erfolgte durch OD260-Messung einer 1:100-Verdünnung des dialysierten Virus (Hauk 2013). Nach der Zugabe von Sucrose-Puffer wurde die Virus-suspension aliquotiert und bei -80°C unter S2-Bedingungen gelagert. Auf die Verwendung eines ansonsten üblichen Reportergens wurde verzichtet, da der Transduktionserfolg direkt über die Fluoreszenz der transduzierten Kardiomyozyten qualitativ und quantitativ bestimmt werden konnte.

Reagenzien	Substanzen	[]
1x Sucrose-Puffer (pH 8,0) Gelöst in ddH ₂ O	Tris (Base)	10 mmol/l
	MgCl ₂ *6H ₂ O	150 mmol/l
	Sucrose	250 mmol/l
20% PEG (Polyethylenglycol) Gelöst in ddH ₂ O	NaCl	2,5 mmol/l
	20% PEG 8000	20 mmol/l
20% NP-40/PBS Gelöst in warmem PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	IGEPAL CA-630 (Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol)	0,08 mmol/l

Tabelle 3 Medien Virusgenerierung und Lagerung

2. Material und Methoden

Reagenzien	Produktangaben
293 A-HEK-Zellen	Invitrogen #R705-07
Dulbeccos`s MEM (DMEM)	Biochrom #F0445
FBS (<i>fetal bovine serum</i>) Superior	Biochrom #S0615
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) Dulbecco	Biochrom #L1825
Trypsin/EDTA solution	Biochrom #L2143
Iscove Basal Medium	Biochrom #FG 0465
Anti-Anti (Antibiotic-Antimycotic (100X): 10.000 units of penicillin (base); 1.000 g of steptomycin (base), 25 g of amphotericin B/m)	Gibco™, Catalog Number 15240

Tabelle 4 Reagenzien zur Viruspräparation

2.3.5 Transduktionsprotokoll

Um eine maximale Fluoreszenz bei minimaler Virustoxizität zu erzielen, wurden im Vorfeld Experimente durchgeführt, um die optimale *Multiplicity of infection* (MOI) zu ermitteln: Alle Transduktionen wurden mit einer MOI von 100 pfu/Zelle durchgeführt: Die Zellsuspension mit den Kardiomyozyten wurde geteilt und je eine Hälfte mit dem Wildtyp (WT)-Virus und eine mit dem T286-deletierten (T2A)-Virus transduziert. Eine Menge von 20.000 Zellen/ml wurde dabei allerdings nicht überschritten, um eine für die Zellqualität schädlich hohe Zelldichte innerhalb der Zellkultur zu vermeiden.

2.4. Zellkultur transfizierter adulter Ratten-Kardiomyozyten

Die Ad-Camv α -Expression erforderte ein Zeitintervall von 48 Stunden, so dass die transduzierten Kardiomyozyten über diesen Zeitraum kultiviert wurden. Zusätzlich bot die Kultivierung die Möglichkeit der Regeneration (Mitcheson et al. 1998).

Die Kardiomyozyten wurden bei 37°C Umgebungstemperatur, 5% CO₂-Begasung und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. 3, 15, 27 und 39 Stunden nach Transduktion erfolgte eine Waschung mit Austausch des Kulturmediums (vgl. Tabelle 5). Zur Überprüfung der Zellqualität im zeitlichen Verlauf wurde vor und nach jedem Austausch eine mikroskopische Beurteilung der Morphologie vorgenommen. Ferner wurden auch kontraktile Verhaltensmuster bewertet. Spontane Kontraktionen während der Kultivierung waren ein Hinweis auf geschädigte Zellen (Piper et al. 1982; Cheung et al. 1985). Des Weiteren wurden die Zellquantität, sowie die Zelldichte und die Fixierung beurteilt. Die einzelnen Versuchszyklen erfolgten mit mehreren Stimulanzien, die unterschiedliche Anforderungen an das Versuchsetting stellten. Die Kultivierung erfolgte auf autoklavierten Deckgläsern in sterilen 6-Well-Multiwell-Kulturplatten für adhärente Zellkulturen (Cyto one; Catalog no: CC7682-7506). Die Deckgläschen wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend in den 6-Well-Multiwell-Kulturplatten mit Laminin (Verdünnung 1:100, Sigma # L2020 1MG) beschichtet. Nachdem das Laminin getrocknet war, konnten die Deckgläschen mit der transfizierten Zellsuspension bedeckt werden.

Reagenzien	Substanzen	[]
Modifiziertes Medium Gelöst in Medium 199 (Invitrogen: 51200-046)	L-Glutamin 100x Stock (biochrom AG: K0283)	2mmol/l
	BDM (2,3-Butanedionmonoxim)	10mmol/l
	Bovine serum albumin (7,5% Lösung: Invitrogen: 15260-037)	0.1%
	Insulin-Transferrin-Selenium G 100x Stock (Invitrogen: 41400-045)	0.025 mmol/l
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	0.02 mmol/l

Tabelle 5 Kultivierungsmedien

2.5. Konfokalmikroskopie

Basis der erfolgreichen Versuchsdurchführung ist eine ausreichend hohe Effizienz des Gentransfers. Dazu ist eine bestimmte Virusmenge bzw. eine Menge von Viruspartikeln pro Zielzelle (MOI) erforderlich. Diese wird allerdings durch die zytotoxischen Nebeneffekte der Advektoren limitiert und unterliegt zudem interindividuellen Schwankungen (Börner et al. 2011). Aus diesen Gründen wurde die notwendige Virusmenge ermittelt, um eine ausreichende Effizienz bei gleichzeitig möglichst hoher Zellqualität zu garantieren.

Als Maß für den Transduktionserfolg werden routinemäßig Fluoreszenzmarker/Reportergene wie GFP genutzt (Lottspeich und Engels 2012). In diesem Fall sind die Fluophoren CFP und YFP die eigentlichen Effektorproteine und ihr Fluoreszenzsignal kann als Maß für die Expressionsrate verwendet werden. Das Fluoreszenzausmaß wurde konfokalmikroskopisch 48 Stunden nach Transduktion bei unterschiedlichen MOI-Werten gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abschnitt 3.2 ausführlich dargestellt.

Die Konfokalmikroskopie wurde genutzt, da sie eine schnelle und einfache Handhabung und eine unkomplizierte Datenauswertung gewährleistet. Abb. 16 zeigt eine schematische Darstellung des Funktionsprinzips der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM).

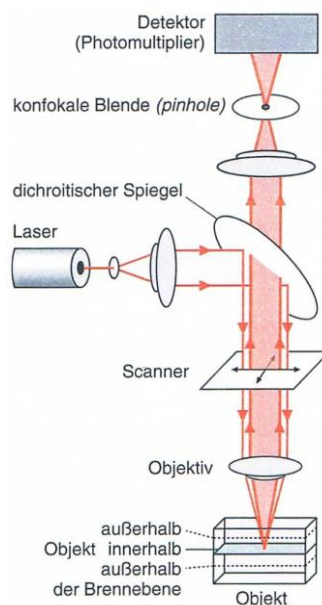


Abbildung 16 Funktionsprinzip der cLSM (Lottspeich und Engels 2012, S. 219)

2.6 Epifluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Das FRET-Phänomen

Der Begriff Fluoreszenz wurde 1852 von dem irischen Physiker G.G. Stokes geprägt und beschreibt die spontane Energieemission durch ein Material nach vorheriger Anregung durch ein höher energetisches Lichtsignal (Stokes 1852). Als erstes fluoreszierendes Protein wurde 1994 GFP aus der Quallenspezies *Aequorea victoria* isoliert (Chalfie et al. 1994). Aus diesem Protein wurden durch Mutationen ca. 30 weitere Fluorophore konzipiert, darunter auch CFP und YFP (vgl. Tabelle 6, Abb. 19B), wodurch das Fluoreszenzphänomen für die dynamische Bildgebung (u.a. FRET) nutzbar gemacht werden konnte (Lottspeich und Engels 2012, S. 213, 214).

Spezies	Fluoreszierendes Protein	Mutante (Alloformen)	Absorption [nm] Minimum	Emission [nm] Maximum
<i>Aequorea victoria</i>	Aequorea-GFP	wtGFP	395	475
		CFP	383	445
		YFP	434	477

Tabelle 6 GFP-Varianten. Modifiziert nach (Lottspeich und Engels 2012, S. 214)

Das Akronym FRET steht für Fluorescence resonance energy transfer und beschreibt das durch Theodor Förster erstmals beschriebene Phänomen eines nicht radioaktiven Energietransfer-Mechanismus zwischen zwei Fluorophoren (Förster 1948).

Der Donor wird energetisch angeregt und überträgt seine Energie in Form von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf den Akzeptor, der daraufhin ein detektierbares Lichtsignal emittiert. Basierend auf dem Jablonski-Energiediagramm (Jablonski 1933) lässt sich die Wechselwirkung zwischen CFP und YFP wie folgt beschreiben (vgl. Abb. 17): Über die Anregung des Donors (CFP mit ~430nm) gelangt dieser vom energetischen Grundzustand S0 in den energetisch höheren Vibrations-Zustand S1. Nach der durchschnittlichen S1-Lebensdauer von $\tau=1-5\text{ns}$ wechselt CFP wieder in den S0-Zustand und emittiert spontan ein wellenlängengrößeres Fluoreszenzphoton (Stokes Shift). Die größere Wellenlänge ergibt sich aus dem vibrationsbedingten Energieverlust nach Absorption. Die "frei" werdende Anregungsenergie wird strahlungsfrei auf den Akzeptor YFP übertragen, der daraufhin ebenfalls spontan ein Fluoreszenz-

2. Material und Methoden

photon emittiert. Es kommt insgesamt zu einer Verminderung der Donor-Fluoreszenzintensität bei gleichzeitiger Steigerung der Akzeptor-Emissionsintensität.

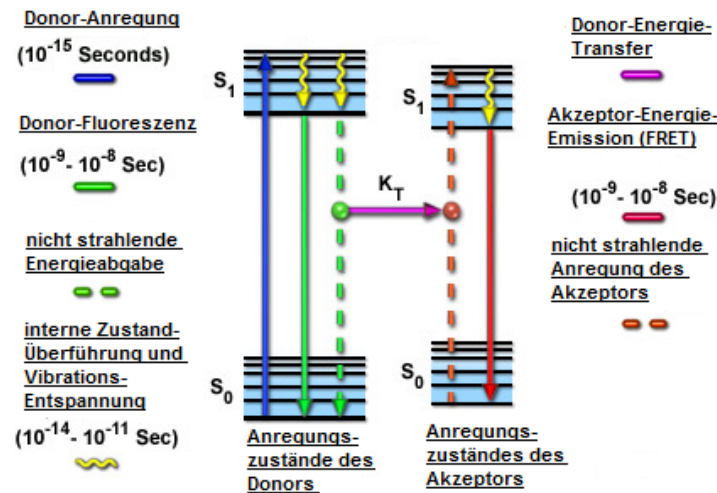


Abbildung 17 Jablonski-Energiediagramm für den Förster Resonanz Energie Transfer. Modifiziert nach (Nikon MicroscopyU | Fluorescence Microscopy | FRET Basics).

Das Phänomen lässt sich als Quotient der Emissionsintensitäten der Farbstoffe CFP und YFP (FRET ratio) quantifizieren und erlaubt Rückschlüsse auf molekulare Wechselwirkungen oder molekulare Strukturveränderungen (Börner et al. 2011; Lottspeich und Engels 2012, S. 26):

$$FRET_{ratio} = \frac{\text{Emissionsintensität des CFP}}{\text{Emissionsintensität des YFP}}$$

Formel 1 Berechnung der FRET ratio

Die Effektivität des Energietransfers, also die Anzahl der Energieübertragungen auf den Akzeptor pro Donor-Anregung, lässt sich als FRET-Effizienz E quantifizieren:

$$E = \frac{\text{Anzahl der Energietransfers}}{\text{Anzahl der Donor - Anregungen}} = \frac{k_{ET}}{k_f + k_{ET} + k_0}$$

Formel 2 Berechnung der FRET-Effizienz E: k_{ET} = Energietransferrate, k_f = Donor-Fluoreszenzrate, k₀ = strahlungsfreien Abbau des Donor-Anregungszustandes. E kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

E ist von drei Faktoren abhängig (Förster 1948): Erstens müssen sich die Donor- und Akzeptor-Absorptionsspektren überlappen, da ansonsten keine Akzeptor-Anregung möglich ist. Berechnet wird dies als Integral der Überlappungsspektren:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \times E_A(\lambda) \times \lambda^4 \times d\lambda$$

Formel 3 Berechnung des Überlappungsintegrals: F_D = die normalisierte Donor-Fluoreszenz (Fluoreszenzquantenausbeute). E_A(λ) = Akzeptor-Anregungs-Spektrum. λ = spektrale Überlappung zw. Donor und Akzeptor.

2. Material und Methoden

Zweitens ist E aufgrund des räumlich begrenzten Dipolfeldes entfernungsabhängig (vgl. Abb. 18A), wobei der maximale Donor-Akzeptor-Abstand (R) 10nm betragen darf und sich invers zur sechsten Potenz des Molekülabstandes reduziert:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

Formel 4 Entfernungsabhängige Berechnung der FRET-Effizienz E

R₀ (vgl. Abb. 18B) steht für den Abstand bei dem der Energietransfer 50% beträgt und der in Anlehnung an den Erstbeschreiber Förster-Radius genannt wird:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} F_D k^2 h^{-4} J(\lambda)$$

Formel 5 Berechnung des Förster-Radius (vgl. Abb. 18B): F_D = Anregungsenergie-Anteil der fluoreszenzabhängig wieder emittiert wird; K (0 bis 4) = Anordnung der Übergangsdipolmomente; h (Refraktionsindex) = Umgebungsmediums-Auswirkung (Bei Wasser h = 1.33). J(λ) = Integral der Spektren-Überlappung (vgl. Formel 3).

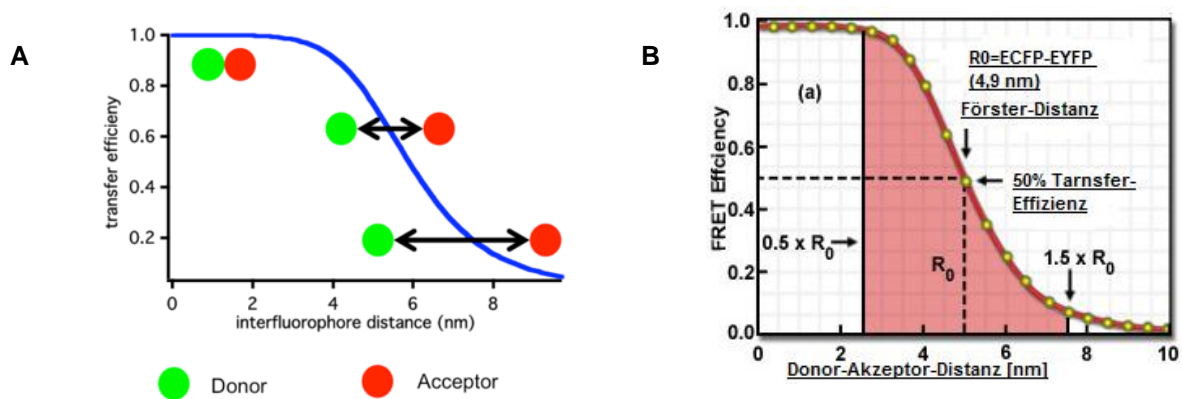


Abbildung 18 A: FRET-Effizienz (E) in Abhängigkeit von der Fluorophor-Distanz (Biophysics of Macromolecules (DKFZ, B040): Research: Single Molecule FRET). B: R₀-Berechnung. Modifiziert nach (Nikon MicroscopyU | Fluorescence Microscopy | FRET Basics)

Drittens findet die Interaktion zwischen dem Donor-Emissionsdipol und dem Akzeptor-Absorptionsdipol statt, so dass eine annähernd parallele Dipol-Orientierung von Donor und Akzeptor notwendig ist (vgl. Abb. 19A).

2. Material und Methoden

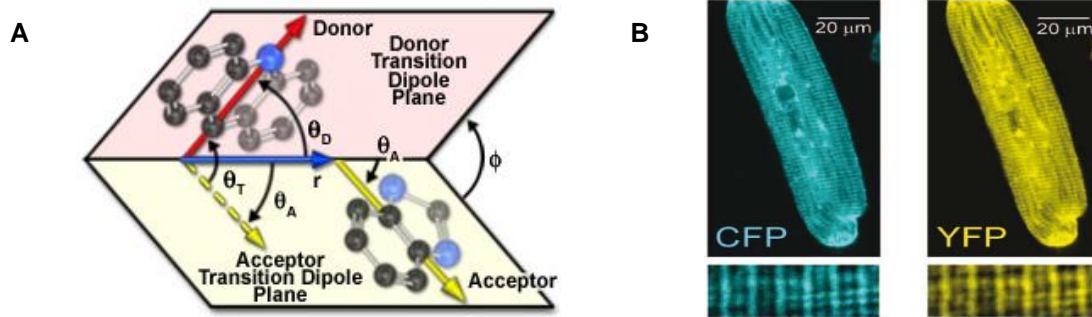


Abbildung 19 A: Dipol-Orientierung von Donor und Akzeptor. r = Donor-Akzeptor-Abstand (Nikon MicroscopyU | Fluorescence Microscopy | FRET Basics). B: Epifluoreszenzmikroskopisch gemessene Lichtsignale nach CFP und YFP-Anregung (Erickson et al. 2011b).

Bezogen auf den Versuchsalgorithmus (vgl. 2.1) haben das FRET-Phänomen und die FRET-Effizienz (E) folgende Bedeutung: Das transgene Camui α -CaMKII-Molekül ist CFP-YFP gekoppelt (vgl. 2.3.2). Die konformationsabhängige Aktivitätsänderung (vgl. 1.1.5.4; Abb. 20A) beeinflusst den CFP-YFP-Abstand und spiegelt sich so in einer Zu- oder Abnahme der FRET RATIO wieder. Bei Aktivierung wird der Abstand vergrößert, und die Energieübertragung vermindert (vgl. Formel 4, 5; Abb. 20): Die CFP-Fluoreszenz nimmt zu, während YFP-Fluoreszenz und FRET-Ratio abnehmen (vgl. Abb. 20B). Die CaMKII-Aktivität lässt sich so quantitativ und qualitativ beurteilen. CFP und YFP eignen sich als Fluophore, weil sie den oben genannten Anforderungen für eine ausreichende FRET-Effizienz genügen.



Abbildung 20 FRET-Phänomen am Beispiel der Camui α gekoppelten CaMKII (Takao et al. 2005). A: Konformationsabhängiges FRET-Signal des Transgenen CaMKII-Moleküls. B: Fluoreszenz-Emissions-Spektrum von Camui α unter CFP-Anregung vor (durchgezogene Linie) und nach (gestrichelte Linie) Ca^{2+} -Zugabe.

2. Material und Methoden

2.6.2 Die Grundlagen der Epifluoreszenzmikroskopie

Das aktivitätsabhängige Fluoreszenzsignal wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie detektiert:

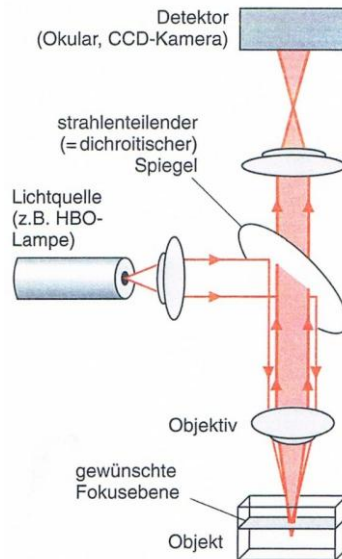


Abbildung 21 Funktionsprinzips der Fluoreszenzmikroskopie (Lottspeich und Engels 2012, S. 209).

Im Gegensatz zur älteren Durchlichtfluoreszenzmikroskopie fungiert das Objektiv gleichzeitig als Kondensor und verfügt über einen Anregungsfilter, einen dichroitischen Spiegel und einen Sperrfilter zwischen Objektiv und okular (vgl. Abb. 21). Durch diese Konstruktion im Strahlengang werden die anregenden Lichtsignale eingebracht. Versuchsdurchführung und Versuchssetting orientierten sich an Börner et al. (2011) und Erickson et al. (2011):

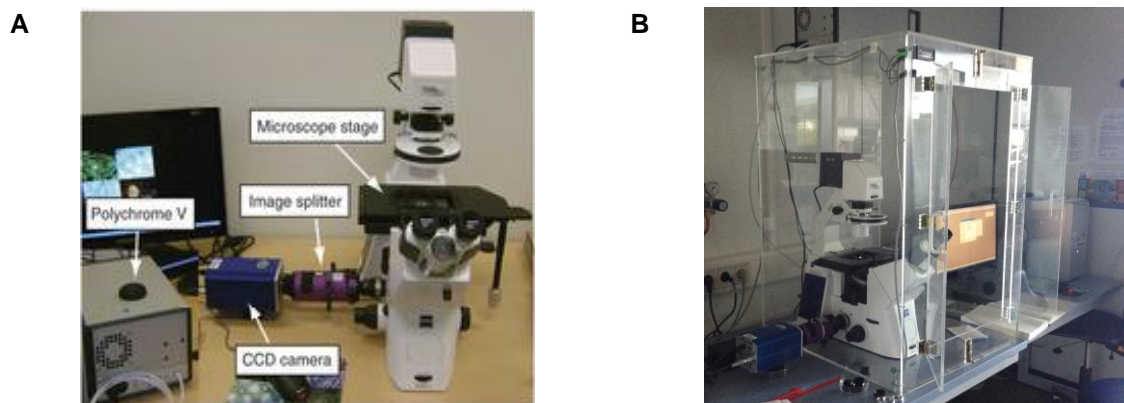


Abbildung 22 Experimentelles Setting. A: Epifluoreszenz-Setting mit monochromatischer Lichtquelle, CCD-Kamera und Image-Splitter (Börner et al. 2011). B: Erweitertes Versuchssettings.

Zur Messung wurde ein inverses Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit einer monochromatischen Anregungsquelle (TILL Polychrome V) verwendet (vgl. Abb. 22), die ein breites Spektrum an anregenden Wellenlängen (320-680nm) bietet und optimale Signal-Rausch-

2. Material und Methoden

Verhältnisse gewährleistet (TILL Photonics Polychrome V monochromator | Forums, Questions, Discussions and Help). Zur simultanen Messung von CFP- und YFP-Emissionssignalen in zwei unabhängigen Kanälen diente das QV2 Multichannel Imaging System (Photometrics QV2 Multichannel Imaging Products: Quad-View Simultaneous Imaging System) zwischen dem Mikroskop und der Cool-SNAP HQ2 CCD-Kamera. Zur Detektion wurden CFP-Extinktionsfilter (T455LP dichroic mirror) für den Donor-Kanal und für den Akzeptor-Kanal, sowie ein CFP-Emissionsfilter (Donor-Kanal) und ein YFP/FRET-Emissionsfilter (Akzeptor-Kanal) verwendet. Dabei handelt es sich um 488/30 nm- (CFP), 530/30 nm- (YFP) und 585/42 nm-Multi-Bandpass-(Interferenz-) Filter, die die Beobachtung mehrerer Fluoreszenzkanäle zur selben Zeit erlauben. Die Fluoreszenzsignale werden mittels dichroitischer 530 nm Shortpass-, 500 nm Longpass- und 560 nm Shortpass- Filter getrennt. Durch das QV2-System können Artefakte oder Verzögerungen, die durch manuellen Filterwechsel entstehen vermieden werden (Börner et al. 2011). Die Verarbeitung der radiometrisch gewonnenen Daten mittels MetaFluor- und MetaMorph-Software machte die Messung der FRET-Signale als real-time FRET-Analyse möglich. In Ergänzung zu dem ursprünglichen Versuchs-Setting (vgl. Abb. 22A) wurde eine Plexiglas-Ummantelung mit integrierter Heizung hinzugefügt (vgl. Abb. 22B), so dass bei einer Umgebungstemperatur von 37°C gearbeitet werden konnte.

Vor der eigentlichen Analyse der Gesamtfluoreszenz wurde die Hintergrundfluoreszenz für jeden Kanal getrennt abgezogen. Weitere potentielle Störfaktoren sind das Photobleaching und der Cross-Talk/Bleed-through: Photobleaching beschreibt die anregungsbedingte Zerstörung des Farbstoffs und die damit einhergehende Abnahme der Fluoreszenzintensität. Zur Vermeidung wird kurz und mit geringer Licht-/Laser-Intensität angeregt. Da der Effekt auch von der Höhe der O₂-Konzentration abhängig ist kann die Zugabe von Ascorbinsäure helfen. Bei simultaner Verwendung mehrerer Farbstoffe kann es bei überlappenden Anregungswellenlängen zur gleichzeitigen Anregung beider Farbstoffe kommen (Cross-talk). Sind die Emissionswellenlängen überlappend, kann der Photomultiplier die einzelnen Farbstoffe nicht mehr unterscheiden (Bleed-through). Die Folge ist, dass ein Signal auch im benachbarten Farbkanal zu sehen ist. Eine Minimierung ist durch den Einsatz enger Bandpass-Filter möglich.

Trotz aller Minimierung ist dennoch eine Korrekturanpassung für Photobleaching und Bleed-through/Cross-talk notwendig (Xia und Liu 2001): Der Korrekturfaktor B (Maß für Cross-

2. Material und Methoden

Talk/Bleed-through) wurde durch Anregung der transduzierten Kardiomyozyten mit 346nm und Messung der Signale im Donor- und Akzeptor-Kanal berechnet:

$$B = \frac{YFP}{CFP} = 1$$

Formel 6 Berechnung des Korrekturkoeffizienten B

D (Maß für Grad der direkten Akzeptor-Extinktion durch Donor-Anregungssignale) wurde berechnet durch Anregung der Kardiomyozyten mit 436nm und 500nm und der Messung der resultierenden Emissions-Intensitäten unter der Donor-Anregungswellenlänge (I_{DA}) und der Akzeptor-Anregungswellenlänge (I_{AA}):

$$D = \frac{I_{DA}}{I_{AA}} = 0.05$$

Formel 7 Berechnung des Korrekturkoeffizienten D

Die Berechnung des Korrekturfaktors YFP_{dir} , der zur Korrektur der Photobleaching-Artefakte verwendet wurde, erfolgte durch Messung myokardialer YFP-Signale vor ($YFP_{prä}$) und am Ende der Messung (YFP_{post}) durch Anregung mit 500nm (Börner et al. 2011):

$$YFP_{dir} = \frac{YFP_{prä}}{YFP_{post}}$$

Formel 8 Berechnung des Korrekturfaktors YFP dir

Zusätzlich wurde bei der Korrektur die Zeit berücksichtigt:

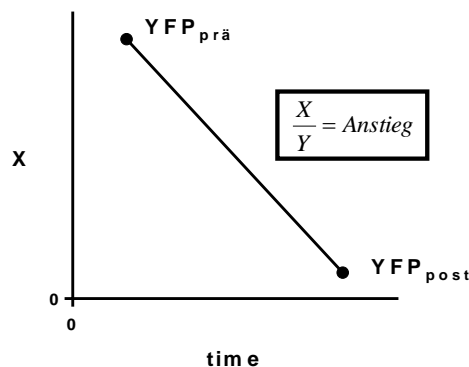


Abbildung 23 Bestimmung des decay slope bzw. Bestimmung der Zeit zwischen $YFP_{prä}$ und YFP_{post}

$$YFP_{dir} = \frac{YFP_{prä} (without back) - YFP_{post} (without back)}{time\ between\ prä\ and\ post}$$

Formel 9 Berechnung von YFP dir unter Berücksichtigung der Zeit

2. Material und Methoden

CFP bedarf nur einer Korrektur, wenn während der Messung massive CFP-Fluoreszenz-Abfälle bemerkt werden (Börner et al. 2011). Mit Hilfe der Korrekturfaktoren konnten die Fluoreszenz im YFP-Kanal (YFP corr) und die FRET ratio berechnet werden:

$$\text{Intensität im YFP Kanal (YFP corr)} = FRET - B \times CFP - D \times YFP_{dir}$$

Formel 10 Berechnung der Intensität im YFP Kanal (YFP corr)

$$FRET\ ratio = \frac{CFP}{FRET_{corr}}$$

Formel 11 Berechnung der korrigierten FRET ratio

2. Material und Methoden

2.7 Messprotokolle und Versuchsdurchführung

2.7.1 Messlösungen

Zur Durchführung der Messprotokolle wurden folgende Messlösungen benötigt:

1. Eine kalziumhaltige Tyrode
2. Eine Ascorbinsäure (ASC)-Tyrode als Grundlösung für die Isoproterenol-Verdünnungsreihe (Stammlösungen I und II)
3. Isoproterenol-Stammlösungen zur Erzeugung einer Isoproterenol-Messlösung mit der Endkonzentration 10^{-7} M
4. Eine Angiotensin-II-haltige Tyrode ($1\mu\text{M}$ ANGII) mit dem Kontrollprotein Scramble ($20\mu\text{M}$)
5. Eine Angiotensin-II-haltige Tyrode ($1\mu\text{M}$ ANGII) mit dem NOX2-Inhibitor gp91-ds-TAT (vgl. 1.4.5) in der Konzentration $20\mu\text{M}$

Die Zusammensetzung der Messlösungen ist in Tabelle 7 dargestellt:

Reagenzien	Substanzen	[]
Ca^{2+} -haltige Messtyrode Gelöst in 1xTyrode	CaCl_2	1 M
Ascorbinsäure (ASC)-Tyrode Gelöst in Ca^{2+} -freier Tyrode	Ascorbinsäure (ASC)	50 mg
	HCL (32%)	5 μl
Stammlösung I (10mM Iso-Stock) Gelöst in ASC-Tyrode	Isoproterenol	10^{-2}M
Stammlösung II (0.01mM Iso-Stock)	Stammlösung I	10^{-2}M
Iso-Endverdünnung 1 (10^{-5}M)	Stammlösung I	10^{-2}M
Iso-Endverdünnung 2 (10^{-6}M)	Stammlösung I	10^{-2}M
Iso-Endverdünnung 3 (10^{-7}M)	Stammlösung II	10^{-5}M
	CaCl_2	1 M
ANGII-Stock (1000fach Vor-ratslösung)	ANGII (Sigma)	1 μM

2. Material und Methoden

Gelöst in ddH ₂ O		
ANG II + Scramble gelöst in Ca ²⁺ -haltiger 1xTyrode	ANGII-Stock	1 µM
	Scramble	20 µM
ANG II + gp91 ds-tat gelöst in Ca ²⁺ -haltiger 1xTyrode	ANGII-Stock	1 µM
	gp91 ds-tat	20 µM

Tabelle 7 Messlösungen

2.7.2 Optimierung der elektrischen Feldstimulation

Zur Aufrechterhaltung einer gleichbleibenden Zellqualität wurde kontinuierlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die anfängliche Kultivierung auf autoklavierten Messkammern führte zu einer massiven Zelldichte und zu Störungen der Messergebnisse, da die Fluoreszenz benachbarter Kardiomyozyten Auswirkungen auf die Signale der Untersuchungszelle zeigten. Aus diesem Grund wurde die Kultivierung auf autoklavierten Deckgläschen fortgesetzt. Um die elektrische Feldstimulation unter diesen Bedingungen artefaktfrei durchzuführen, wurde in Zusammenarbeit mit der technischen Abteilung der UMG eine passende Elektrode entwickelt (vgl. Abb. 24).

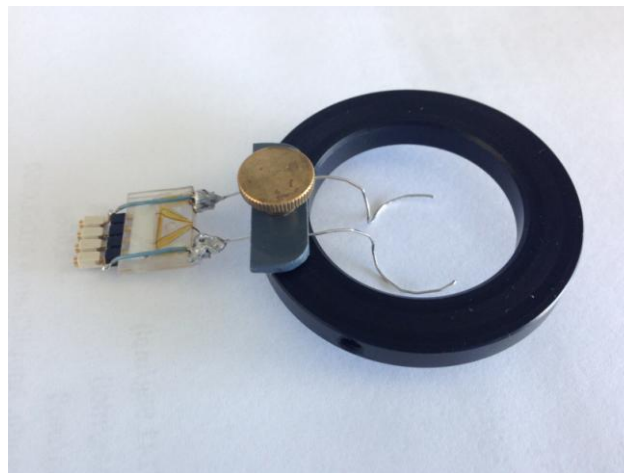


Abbildung 24 Elektrode zur Stimulation der Wildtyp (WT)-/Threnonin286-deletierten (T2A)-Kardiomyozyten mittels elektrischer Feldstimulation

2. Material und Methoden

2.7.3 Versuchsdurchführung

Die Gesamtdauer eines Versuchsablaufs betrug inklusive Isolation, Kultur und Transduktion zwei bis vier Tage. Die Reagenzien (vgl. Tabelle 7) wurden präexperimentell im Wärmebad auf 37°C erwärmt. Die Versuchszellen wurden bis zum Beginn der Messung im Brutschrank aufbewahrt. Während der Messungen wurde eine Umgebungstemperatur von ca. 37°C aufrechterhalten (vgl. Abb. 22B). Insgesamt wurden fünf verschiedene Versuchsreihen durchgeführt:

1. Isolierte elektrische Feldstimulation (Pacing; 2Hz, 20mV) über einen Zeitraum von 600s und anschließende Beobachtung für 600s.
2. Isolierte pharmakologische Stimulation mittels Isoproterenol (10^{-7} mmol/l) über einen Zeitraum von 600s.

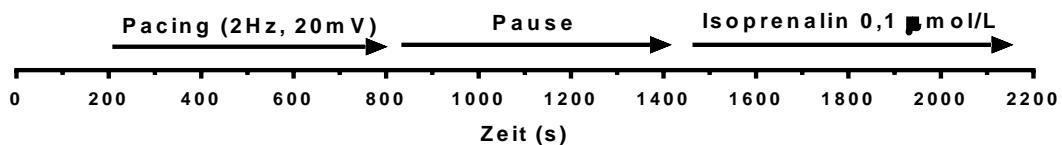


Abbildung 25 Isolierte elektrische Feldstimulation (Pacing) und isolierte pharmakologische Stimulation mittels Isoproterenol

3. Simultane elektrische und pharmakologische Stimulation (2Hz, 20mV) und Isoproterenol (10^{-7} mmol/l) für 600s mit anschließender Beobachtung für 1000s. Zu beachten ist, dass Isoproterenol nicht ausgewaschen wurde.

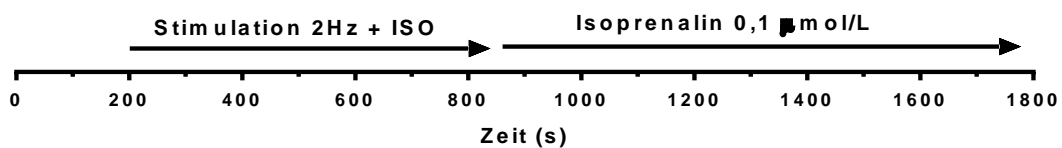


Abbildung 26 Simultane elektrische und pharmakologische Stimulation (2Hz, 20mV + Isoproterenol 0,1µmol/l) und anschließend Fortführung der alleinigen pharmakologischen Stimulation

4. Stimulation mit ANGII (1µM) und dem als Negativ-Kontrolle genutzten Kontrollprotein Scramble (20µM) für 600s und anschließende Beobachtung für 1000s.

2. Material und Methoden

5. Stimulation mit ANGII ($1\mu\text{M}$) und dem NOX2-Inhibitor gp91-ds-tat ($20\mu\text{M}$) (vgl. 1.4.5) und anschließende Beobachtung für 1000s.

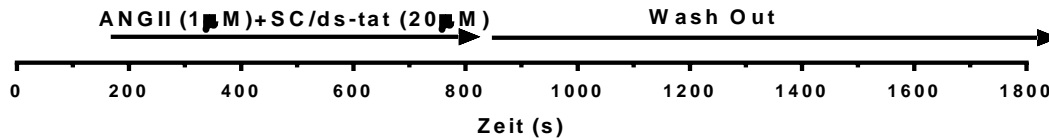


Abbildung 27 Stimulation mit ANGII und gp91-ds-tat oder mit ANGII und Scramble

Für die Experimente wurden die Zellen auf autoklavierten, laminierten Deckgläschen in six wells (Cat. No.: CC7682-7506) kultiviert die anschließend in die extra zu diesem Zweck entwickelte Elektrodenvorrichtung (vgl. Abb. 24; Abschnitt 2.7.2) überführt und mit der jeweiligen Messtyrode (vgl. Tabelle 7) beschichtet. Über eine Ölemulsion wurde der Kontakt zwischen Objektiv und Deckglas hergestellt. Pro Messung konnte eine Zelle erfasst werden. Die Auswahl der Zielzelle erfolgte anhand der in Tabelle 9 beschriebenen Kriterien. Je nach Versuchsreihe dauerte ein Messzyklus ca. 30-40 Minuten. Um phototoxische Nebeneffekte und Artefakten zu vermeiden wurde eine einheitliche Anregungsintensität und Anregungsdauer gewählt. Während der Messung erfolgte alle 15s eine Bildaufnahme. Zu Beginn jeder Messung erfolgte eine Beobachtung für 210s bis zum Erreichen des Steady state. Im Anschluss wurde die elektrische bzw. pharmakologische Stimulation begonnen und die Zelle beobachtet. Dabei waren vor allem die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Aktivität nach Stimulationsbeginn und die Zeitspanne bis zur kompletten Aktivierungsrückbildung nach Stimulationsende von Interesse. Außerdem wurden das maximalen Aktivitätsausmaß und die morphologischen Zellveränderungen dokumentiert.

Unter pharmakologischer Anregung erfolgte bei Stimulationsbeginn ein Lösungswechsel mit dem entsprechenden Reagenz (vgl. Tabelle 7). Bei Stimulationsende wurde das Pharmakon wieder ausgewaschen. Während der Lösungswechsel wurde die Messung pausiert. Vor Wiederaufnahme der Messung wurde in Anbetracht der mechanischen Irritation eine lichtmikroskopische Lokalisationskontrolle vorgenommen. Bei Bedarf erfolgte eine Rejustierung der Zelle. Die Lösungswechsel wurden mittels Pipette vorgenommen.

Protokoll	Pacing [s]	ISO [s]	Pacing+ISO [s]	ANGII+SC [s]	ANGII+gp91 [s]
START Messung	0	0	0	0	0
START Stimulation	210	1410	210	210	210
ENDE Stimulation	810	2010	810	810	810
Beobachtung	Über 600	keine	Über 600	Über 600	Über 600
ENDE Messung	2010	2010	1810	1810	1810

Tabelle 8 Messprotokolle

2.8 Auswertung der Rohdaten

Die Daten-Qualität war abhängig, von der Qualität der Zellkultur, der Fixierung der Versuchszellen und der Zelldichte. Zur Generierung valider Erkenntnisse und zur adäquaten Darstellung war eine mehrstufige Aufbereitung der gesammelten Rohdaten notwendig:

Zunächst wurden die Messergebnisse in das Programm IMAGE J überführt und die Fluoreszenzsignale in numerische Werte umgewandelt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns normalisiert. Zu beachten war die Auswahl der entsprechenden Region of interest (ROI): In der ROI 1 wurde die gesamte Zelle erfasst, in der ROI 2 das nukleäre und in der ROI 3 das zytoplasmatische Kompartiment. Die Korrekturanpassungen (vgl. 2.6) und die Berechnung der FRET ratio erfolgten mittels Windows Excel.

Zur graphischen Darstellung und zur statistischen Auswertungen wurde die Software PRISM genutzt: Die graphische Darstellung umfasste je eine Originalregistrierung pro Versuchsalgorithmus und die gebündelten Darstellungen der Wildtyp-Varianten und der Mutanten, sowie der nukleären und der zytoplasmatischen Kompartimente. Die Daten wurden mittels One- und Two-Way-ANOVA-Tests statistisch ausgewertet. Diese Auswertungsschritte erfolgten für alle Daten uniform.

3. Ergebnisse

3.1. Einführung in den Versuchsalgorithmus und Darstellung der Daten

Obwohl die CaMKII eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz einnimmt (Maier 2009; Sag et al. 2009; Sossalla et al. 2010; Erickson et al. 2011a), ist bisher wenig über ihre genaue Reaktionskinetik bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden deshalb schwerpunktmäßig die Reaktionsmechanismen und die Reaktionskinetik der CaMKII untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die Reaktionskinetiken eines Wildtyps (WT) denen von Zellen, die eine Enzymvariante ohne Autophosphorylierungsmöglichkeit exprimieren (Mutation von Threonin 286 zu Alanin, T2A) gegenübergestellt. Die CaMKII-Aktivierung erfolgte in fünf verschiedenen Versuchsalgorithmen mit elektrischer Feldstimulation, mit Isoproterenol, mit Angiotensin II und kombiniert mit elektrischer Feldstimulation und mit pharmakologischer Anregung der β -Rezeptoren durch Isoproterenol. Dadurch ließen sich die physiologischen Aktivierungswege nachbilden: Ca^{2+} /CaM-Anbindung, Autophosphorylierung und Oxidation (vgl. 1.5.4 und 2.6.2).

Zur Generierung hochqualitativer, möglichst artefaktfreier Ergebnisse, wurden die Versuchsbedingungen, wie in Abschnitt 3.2 erläutert, optimiert. Ab Abschnitt 3.3 folgt die Präsentation der Daten aus den fünf Versuchsalgorithmen. Zwecks besserer Anschaulichkeit wird für jede Versuchsreihe zunächst die Originalregistrierung einer einzelnen Zelle präsentiert, an die sich die Auswertung der Mittelwerte und der statistischen Fehler anschließt. Danach folgen die qualitativen und quantitativen Analysen der Veränderungen der FRET-Signale (Geschwindigkeitskonstante k und Amplitude) mittels Two-Way-ANOVA. Um auch Erkenntnisse über subzelluläre Kompartimente zu gewinnen, erfolgt zusätzlich die Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivierung im Zytoplasma und im Nukleus.

Die Kardiomyozyten wurden nach Beendigung des Versuchsalgorithmus für weitere fünf Minuten, vor allem im Hinblick auf ihr morphologisches Verhalten (vgl. Tabelle 9), beobachtet. Um Verfälschungen durch präfinale Artefakte zu vermeiden, wurden die Daten von Zellen mit postexperimentellem Zelluntergang nicht mit aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.2. Optimierung der Transduktions- und Versuchsbedingungen

In vivo Experimente ermöglichen die Visualisierung dynamischer Prozesse in Echtzeit und sind unverzichtbar für die Beobachtung von physiologischen Metabolismen (Louch et al. 2011) und von Reaktionskinetiken.

Entscheidend für die artefaktfreie Umsetzung der durchgeführten Experimente war die Kombination aus guter Fluoreszenzintensität und bestmöglicher Zellqualität der zu untersuchenden Kardiomyozyten. Die Fluoreszenzintensität ist maßgeblich abhängig von der Transduktionseffizienz des adenoviralen Vektors, während die Güte der Versuchszellen von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Dazu zählen unter anderem Isolations- und Kulturbedingungen, die Wahl der Versuchstiere und die zytotoxischen Nebenwirkungen der Transduktion. Um optimale Transduktions- und Versuchsbedingungen während der Experimente zu gewährleisten, wurde eine Reihe von Vorexperimenten durchgeführt.

3.2.1 Optimierung der Isolations- und Kulturbedingungen

Die Isolation erfolgte nach dem Verfahren von Langendorff (Langendorff 1895). Für die Kultivierung wurde ein etabliertes Medium verwendet (Börner et al. 2011). Auf die Nutzung von BDM als Bestandteil der Versuchslösung wurde verzichtet, um eine Beeinflussung der electrophysiologischen Zelleigenschaften zu vermeiden (Verrecchia und Hervé 1997; Watanabe et al. 2001). Die detaillierte Darstellung ist in den Abschnitten 2.2 und 2.4 zu finden.

3.2.2 Quantitative Ermittlung der Transduktionseffizienz

Zur Ermittlung der MOI bei der eine maximale Transduktionseffizienz bei gleichzeitiger Minimierung der adenoviralen Zytotoxizität gegeben ist, wurden Kardiomyozyten mit aufsteigenden Viruskonzentrationen (MOI 0, 20, 50, 100 und 150) transduziert, über 48 Stunden kultiviert und anschließend konfokalmikroskopisch (Zeiss, cLSM5 Pascal, vgl. 2.5) vermessen. Die Beurteilung der Transduktionseffizienz erfolgte quantitativ durch die Bestimmung des Anteils α -positiver Kardiomyozyten (Fluoreszenz bei Anregung mit 540 nm Wellenlänge) in zehn Gesichtsfeldern pro Messkammer mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 58 Kardiomyozyten. Für jede MOI wurden 6 Messkammern aus insgesamt 3 Isolationen ausgewertet.

Abb. 28 zeigt eine repräsentative Darstellung:

3. Ergebnisse

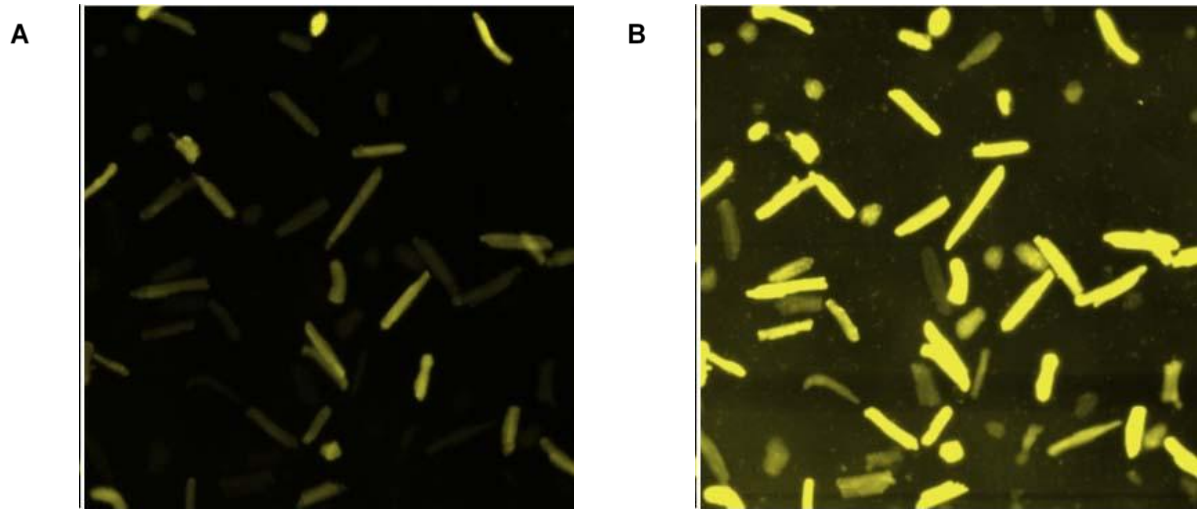


Abbildung 28 A: Darstellung der Zellfluoreszenz isolierter Ratten-Kardiomyozyten nach Transduktion mit Ad-Camui α (MOI 10 pfu/Zelle; 48 h Kultur; YFP-Fluoreszenz-Anregung mit 540nm; Emissions-Messung bei >560nm; Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5>; 40fache Vergrößerung). **B:** Autofluoreszenz im selben Gesichtsfeld (MOI 10 pfu/Zelle; 48 h Kultur) mittels high intensity laser (Anregungswellenlänge 540nm, Emissions-Messung bei >560nm).

3. Ergebnisse

Abb. 29 zeigt die Entwicklung der Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von der Viruskonzentration (MOI) als Hyperbelfunktion mit der beschreibenden Gleichung $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - \exp(-k \cdot x))$. Die Gleichung wurde durch interaktive Annäherung (Fitting) mittels GraphPad Prism ermittelt. Y_0 ist der Y-Wert zum Zeitpunkt $X=0$. Plateau ist der Y-Wert zum Zeitpunkt $X=\infty$. Beide haben dieselbe Einheit wie die Y-Achse. k ist die Geschwindigkeitskonstante, ihre Einheit ist reziprok zur Einheit der X-Achse.

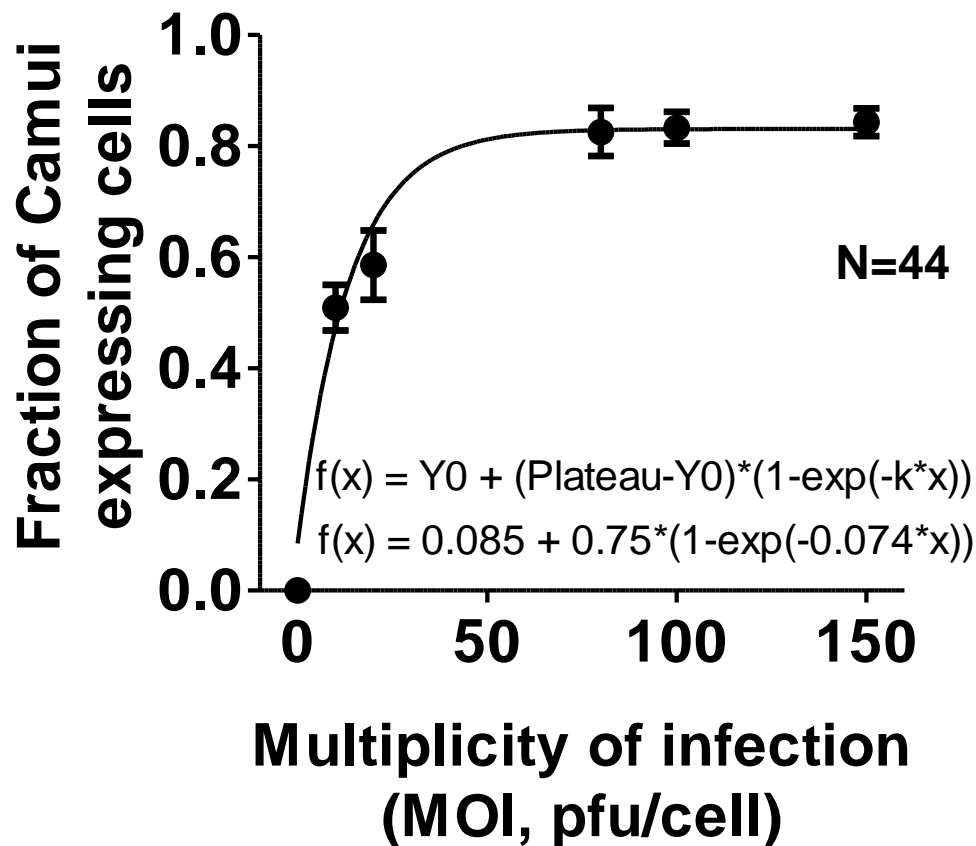


Abbildung 299 Anteil fluoreszierender Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Viruskonzentration (MOI). $Y_0=0.085$; $k=0.074 \text{ s}^{-1}$; Plateau= 0.83.

3.2.3 Zellqualitätsbestimmung anhand der Zellmorphologie

Eine sichere Methode zur Bestimmung der Zellqualität einer Isolations-/Kulturpopulation ist die qualitative Beurteilung anhand von Zellmorphologie und Zelleigenschaften (Piper et al. 1982; Piper et al. 1988; Louch et al. 2011). Zu diesem Zweck wurde zeitgleich zur quantitativen Bestimmung der Transduktionseffizienz eine qualitative Beurteilung der Kardiomyozyten vorgenommen. Die herangezogenen Kriterien (Piper et al. 1982) sind in Tabelle 9 und Abb. 30 dargestellt:

3. Ergebnisse

Pro (gute Zellqualität)	Contra (schlechte Zellqualität)
Zylinder- / Stäbchenform	Runde Zellform; abgerundete Zellränder
Scharf konturierte Zellbegrenzungen	"Fransenartiger" Zellrand
Scharf konturierte Riffelung	Verwaschene Riffelung
Keine spontanen Kontraktionen	Spontane Kontraktionen
Keine Hyperkontrakturen	Hyperkontrakturen
Kontraktile Antwort auf elektrische Stimulation	Ausbleibende Antwort auf elektrische Stimulation

Tabelle 9 Morphologische und elektrophysiologische Zelleigenschaften zur Beurteilung der Zellqualität unter Isolations- und Kulturbedingungen (Piper et al. 1982; Piper et al. 1988; Volz et al. 1991; Louch et al. 2011). Die Kardiomyozyten wurden zur Eruierung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften mit Frequenzen von 0,5Hz und 2Hz für jeweils 30 Sekunden stimuliert und ihr Antwort-Verhalten beobachtet.

Pro und contra beziehen sich auf die Verwendbarkeit der Kardiomyozyten für eine Messung im Versuchsalgorithmus. Zur Einstufung als Zellen guter Qualität musste eine Zelle zwingend elektrisch stimulierbar, ohne Hyperkontraktur und ohne spontane Kontraktionen sein. Abweichende Zellformen und verwaschene Konturen wurden bis zu einem gewissen Grad toleriert.

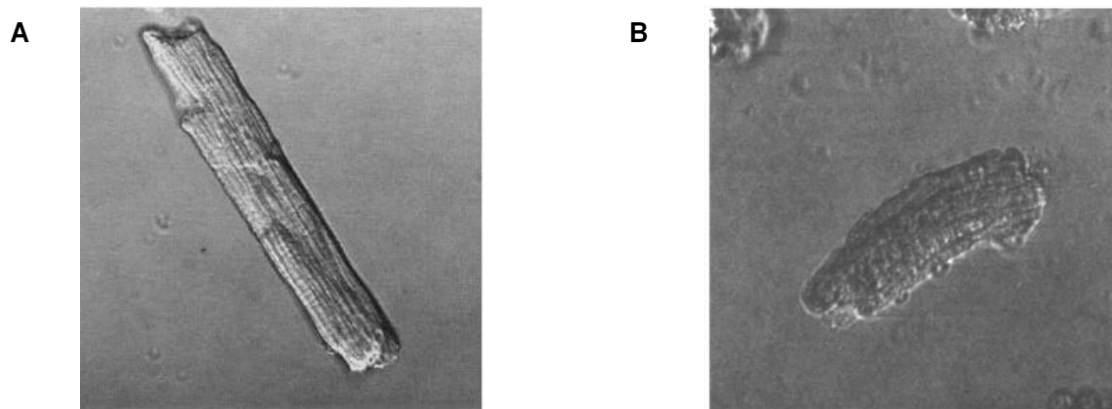


Abbildung 30 Morphologische Kriterien zur qualitativen Zellbeurteilung. A: Gute Zellqualität: zylindrische Form, scharfe Zellbegrenzung, deutliche Zellriffelung. B: Schlechte Zellqualität; vermutlich präfinale Zelle: abgerundete Zellform, unregelmäßiger Zellrand, verwaschene Zellriffelung.

Die Anzahl der gemessenen Zellkammern und Gesichtsfelder pro MOI, sowie die durchschnittliche Zelldichte pro Gesichtsfeld entspricht denen der quantitativen Transduktionseffizienz-Bestimmung. Abb. 31 zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, die als qualitativ gut eingestuft wurden, bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Kardiomyozyten und in Ab-

3. Ergebnisse

hängigkeit von der verwendeten MOI. Wie zu erwarten, nimmt die Güte der Versuchszellen mit steigender Virusexposition ab.

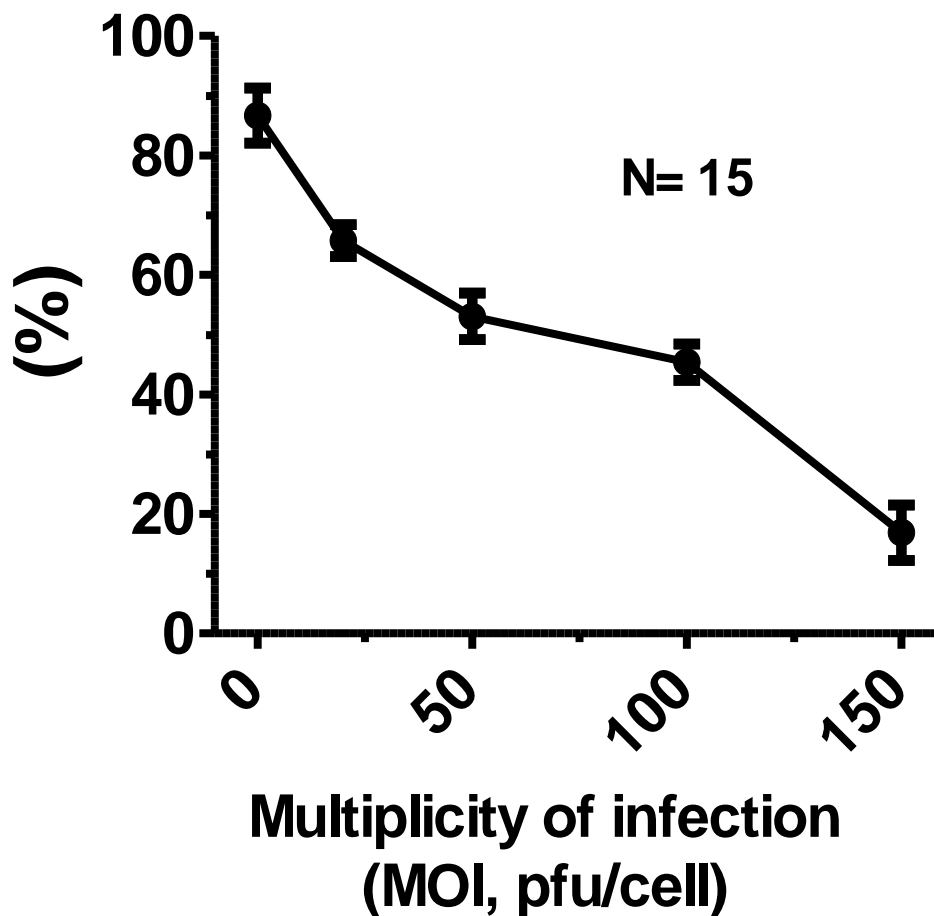


Abbildung 31 Prozentualer Anteil der Zellen guter Qualität in Abhängigkeit von der transduzierten Virusmenge (MOI). Verwendet wurden Kardiomyozyten der adulten Ratte, die nach Transduktion über 48 Stunden kultiviert und dann vermessen wurden.

Aus den Abb. 29 und 31 lässt sich schlussfolgern, dass eine Steigerung der MOI über 100 pfu/Zelle nicht sinnvoll ist. Die zusätzliche minimale Fluoreszenzsteigerung geht mit einem massiven Abfall der Zellqualität einher und würde die Qualität zukünftiger Messdaten beeinträchtigen. Mit Bezug auf diese Ergebnisse wurde die MOI für alle Versuchsreihen auf 100 pfu/Zelle festgelegt. Diese Resultate decken sich mit Ergebnissen aus anderen Experimenten, die eine gute Transduktionseffizienz in adulten Kardiomyozyten bei einer MOI von 100 pfu/Zelle beschreiben (Chen et al. 2005; Heger et al. 2009; Kettlewell et al. 2009).

3. Ergebnisse

3.2.4 Auswahl der Versuchstierspezies

Obwohl der Sensor Ad-Camui α theoretisch sowohl mit Maus- als auch mit adulten Ratten-Kardiomyozyten kompatibel ist, wurden für die Experimente ausschließlich Kardiomyozyten der adulten Ratte verwendet und zwar aus folgenden Gründen:

Eine prolongierte Zellkultur von 48 Stunden ist mit Mauskardiomyozyten auch ohne adenovirale Behandlung nur eingeschränkt durchführbar. Aussagekräftige Messungen waren allerdings nur bei guter Fluoreszenz möglich und dafür wurde eine MOI von 100 pfu/Zelle benötigt. Die adenovirale Toxizität bei dieser MOI führte dazu, dass nahezu 90% der Maus-Kardiomyozyten während der 48 stündigen Kultur apoptotisch wurden. Die verbleibenden Zellen zeigten eine schlechte Zellqualität (vgl. Tabelle 9) und waren entweder nicht elektrisch stimulierbar bzw. nicht fluoreszierend oder sie wurden spätestens unmittelbar nach der Versuchsdurchführung (vgl. 2.7.3) ebenfalls apoptotisch. Die wenigen Maus-Zellen, die verwendet werden konnten, zeigten zudem schlechte Versuchsergebnisse und eine große Anzahl von Artefakten, von denen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sie auf einer präfinalen Veränderung der elektrophysiologischen Zelleigenschaften beruhten.

Die Ratten-Kardiomyozyten zeigten sich hingegen robuster gegenüber der adenoviralen Toxizität (vgl. 3.2.2 und 3.2.3).

3. Ergebnisse

3.3 Stimulation mit elektrischer Feldstimulation und mit Isoproterenol

3.3.1 Der Versuchsalgorithmus

In diesem Versuchsalgorithmus wurde die CaMKII zunächst mit elektrischer Feldstimulation und anschließend β -adrenerg mit Isoproterenol stimuliert. Die elektrisch getriggerte CaMKII-Aktivierung beruht vorrangig auf einer gesteigerten Interaktion des Enzyms mit dem Ca^{2+} /CaM-Komplex (Hudmon und Schulman 2002b). Die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren (Isoproterenol) kann neben einer gesteigerten Ca^{2+} /CaM-CaMKII-Interaktion auch zu einer ROS-Produktion führen (Erickson et al. 2011a) (vgl. 1.4, 1.5). Sowohl die Wildtyp-Kardiomyozyten (**WT**), als auch die, welche die CaMKII-Mutante exprimieren (**T2A**) wurden zunächst für drei Minuten ohne Stimulation gemessen, um so Bleaching-Artefakte zu erkennen und abzustellen (Börner et al. 2011). An das darauffolgende zehnminütige elektrische Stimulationsintervall (2Hz; 20mV) schloss sich eine ebenfalls zehnminütige Stimulationspause an. Im Anschluss wurden die Kardiomyozyten für 13 Minuten mit Isoproterenol (0,1 $\mu\text{mol/L}$) stimuliert. Die Beobachtungsdauer pro Zelle betrug 36,5 Minuten. Die Messungen erfolgten kontinuierlich mit Lichtanregung und Bildaufnahme alle 15 Sekunden. Ausgewertet wurden zytoplasmatische und nukleäre Kompartimente.

3.3.2 Originalregistrierung im Zytoplasma (Wildtyp (WT))

Abb. 32 zeigt beispielhaft die Veränderung der Camui α -Fluoreszenz als Funktion der Zeit unter dem oben beschriebenen Versuchsalgorithmus im Zytoplasma (WT; N=1). Nach Beginn der elektrischen Feldstimulation zeigt sich ein exponentieller Anstieg der FRET ratio als Maß der CaMKII-Aktivität, der sich durch die exponentielle Funktion $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - e^{k \cdot x})$ beschreiben lässt. Nach Stimulationsende (bei 810s) setzt sich der Aktivitätsanstieg kurzzeitig (bis ca. 880s) fort, ist anschließend aber nahezu vollständig reversibel. Die Aktivitätsrückbildung kann ebenfalls einer exponentiellen Funktion angenähert werden: $f(x) = (Y_0 - \text{Plateau}) \cdot e^{-k \cdot X} + \text{Plateau}$. Die Geschwindigkeit von Aktivitätsanstieg ($k = 1.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und Aktivitätsrückbildung ($k = -2.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) sind annähernd gleich groß, wobei die Rückreaktion dezent langsamer abläuft. Die Amplitude unter elektrischer Feldstimulation zeigt ein Ausmaß von 8,68% (FRET-Ratio).

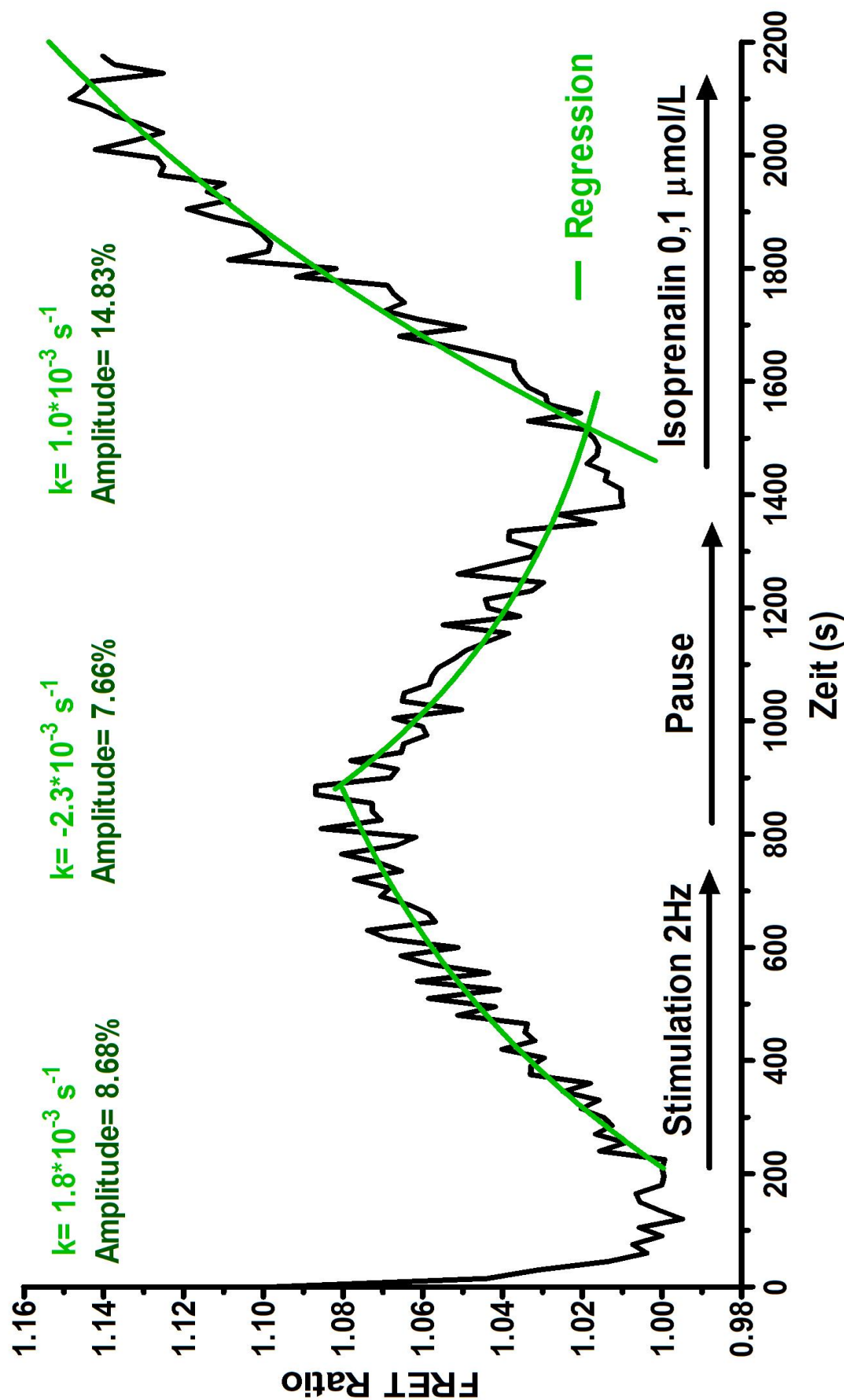


Abbildung 32 Originalregistrierung unter elektrischer und pharmakologischer Stimulation im Zytoplasma (Wildtyp; N=1).

3. Ergebnisse

Nach Beginn der pharmakologischen Stimulation mit Isoproterenol zeigt sich ein kontinuierlicher exponentieller Anstieg der CaMKII-Aktivität bzw. der FRET-Ratio, der sich mit der Regressionsgleichung $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - e^{-k \cdot x})$ beschreiben lässt. Die Geschwindigkeitskonstante ist mit $k = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ deutlich langsamer als unter elektrischer Feldstimulation. Allerdings zeigt sich eine größere Amplitude (14,83%). Dies deutet auf eine deutlich stärkere Aktivierung, möglicherweise aufgrund vermehrter Autophosphorylierung oder Oxidation hin. Dieses Amplitudenausmaß ist vereinbar mit Ergebnissen aus vorangegangenen Experimenten (Erickson et al. 2011b).

3.3.3 Gegenüberstellung von Wildtyp (WT)-Zellen und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma

Die gemittelten zytoplasmatischen Reaktionsverläufe von Wildtyp-Zellen (WT; N=16) und Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A; N=32) wurden in Abb. 33 gegenübergestellt.

Im Wildtyp (WT) zeigt sich ein exponentielles Reaktionsverhalten, das sich für beide Aktivitätsentwicklungen (elektrische Feldstimulation und Stimulation der β -Rezeptoren mit Isoproterenol) mit der Regressionsfunktion $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - e^{-k \cdot x})$ beschreiben lässt.

Die Aktivitätsrückbildung in der Stimulationspause (810 - 1410s) kann mit der Funktion $f(x) = (Y_0 - \text{Plateau}) * e^{-k \cdot x} + \text{Plateau}$ charakterisiert werden. Unter elektrischer Feldstimulation ist die Aktivierungsgeschwindigkeit mit $k = 2.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ annähernd doppelt so schnell wie die unter β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol ($k = 1.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Dafür kommt es allerdings unter Stimulation mit Isoproterenol zu einer deutlich stärkeren Aktivierung (Amplitude $13,5\% \pm 0.59\%$) als unter elektrischer Feldstimulation (Amplitude $6,96\% \pm 0.46\%$). Die Stimulation der β -Rezeptoren führt demnach zu einer stärkeren Enzymaktivität mit jedoch verzögerter Aktivierungsgeschwindigkeit, vermutlich über den Mechanismus der Autophosphorylierung. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Experimenten (Erickson et al. 2011).

Um die Bedeutung der CaMKII Autophosphorylierung genauer zu untersuchen, erfolgten parallele Experimente in Herzmuskelzellen, welche die autophosphorylierungsunfähige CaMKII-Mutante exprimierten (T2A). Auch diese Kardiomyozyten zeigen unter elektrischer Feldstimulation einen nahezu vollständig reversiblen Aktivitätsaufbau mit etwa der gleichen Geschwindigkeit für Aktivitätsentwicklung ($k = 1.8 \cdot 10^{-3} \pm 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) und Aktivitätsrückbildung ($k = -1.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (vgl. Abb. 33). Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) ist unter elektrischer Feldstimulation ($k = 1.8 \cdot 10^{-3} \pm 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) nahezu dreimal so schnell wie

3. Ergebnisse

unter β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol ($k=0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen zeigt sich bei den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) keine gesteigerte CaMKII-Aktivität unter β -adrenerger Stimulation (Amplitude $4.3\% \pm 0.92\%$) gegenüber der elektrischen Feldstimulation (Amplitude $6.44\% \pm 1.1\%$). Im Gegenteil, die Amplitude unter elektrischer Feldstimulation ist ca. 1,5 Mal so groß wie die unter Anregung mit Isoproterenol (vgl. Abb. 33).

Vergleicht man die Wildtyp-Zellen (WT) mit den Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A), fällt auf, dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) im Wildtyp unter elektrischer Feldstimulation und unter Isoproterenol schneller ist als in den die Mutante exprimierenden Kardiomyozyten (T2A). Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol ist die k -Konstante der Wildtyp-Zellen ($k=1.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) sogar annähernd doppelt so groß wie die in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante ($k=0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

Auch das CaMKII-Aktivitätsausmaß (Amplitude) ist in den Wildtyp-Zellen (WT) gegenüber der die Mutante exprimierenden Kardiomyozyten erhöht: Unter elektrischer Stimulation ist der Unterschied nur marginal (Amplitude WT $6.96\% \pm 0.46\%$; Amplitude von T2A $6.44\% \pm 1.1\%$), dafür ist die Amplitude des Wildtyp (WT) mit $13.5\% \pm 0.59\%$ unter Stimulation mit Isoproterenol annähernd dreimal so groß wie die der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) (Amplitude $4.3\% \pm 0.92\%$).

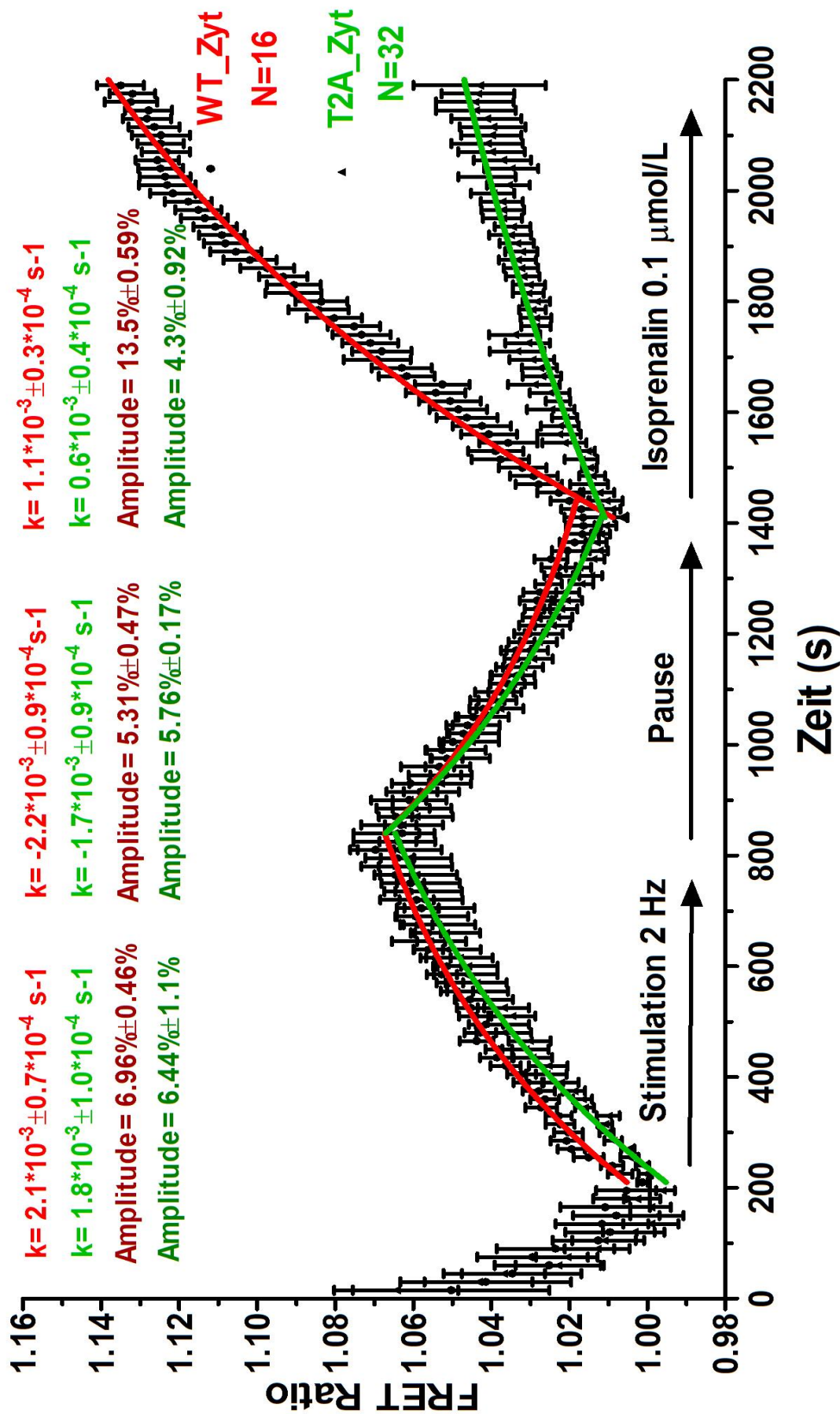


Abbildung 33 Gegenüberstellung der Reaktionskinetik von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma.

Die FRET-Ratio ist als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit bei 210s auf 1 normiert. Untersucht wurden Ratten-Kardiomyozyten (Ad-Camui α ; 48h Kultur; WT N=16; T2A N=32). Elektrische Stimulation (2Hz, 20V) von 200s - 800s; Pharmakologisch (Iso 0.1 $\mu\text{mol/L}$) von 1410s - 2200s; Ruhephase von 810s - 1410s. Als Surrogat für die Schnelligkeit der Enzymreaktion sind die k-Werte, als Hinweise auf die Aktivierungsstärke die Amplituden abzulesen.

3.3.4 Gegenüberstellung von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit CaMKII-Mutante (T2A) im Nukleus

Zusätzlich zur Untersuchung der CaMKII-Aktivität unter verschiedenen Stimuli ist auch das Reaktionsverhalten in subzellulären Kompartimenten von Interesse. Zu diesem Zweck wurden auch die nukleären Daten der Wildtyp (WT)-Zellen und der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) ausgewertet. Der Versuchsalgorithmus entspricht dem im Zytoplasma (vgl. 3.3.1).

Die nukleären Reaktionsverläufe (Abb. 34) im Wildtyp (WT) und in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante entsprechen grob denen im Zytoplasma (Abb. 33) und lassen sich ebenfalls mit exponentiellen Regressionsfunktionen beschreiben: $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - e^{-k \cdot x})$ für den Aktivitätsaufbau unter elektrischer Feldstimulation bzw. unter Stimulation mit Isoproterenol und $f(x) = Y_0 \cdot e^{-k \cdot x}$ für die Aktivitätsrückbildung während der Stimulationspause (810-1410s).

Im Wildtyp (WT) kommt es unter elektrischer Stimulation zu einem Aktivitätsaufbau ($k = 1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) und nach Stimulus-Ende zu einer gleich schnellen Rückreaktion ($k = -1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Im Vergleich zur Anregung mit Isoproterenol ($k = 0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; Amplitude $10.8\% \pm 0.09\%$, vgl. Abb. 34) zeigt sich unter elektrischer Feldstimulation zwar eine doppelt so schnelle CaMKII-Aktivierung ($k = 1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 34) mit einer allerdings nur halb so großen Amplitude ($5.44\% \pm 0.47\%$, vgl. Abb. 34). Dies entspricht den Verhältnissen im Zytoplasma (vgl. Abb. 33).

Im Nukleus der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante zeigt sich unter elektrischer Feldstimulation eine doppelt so schnelle CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit ($k = 1.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ vgl. Abb. 34) wie unter Stimulation mit Isoproterenol ($k = 0.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ vgl. Abb. 34). Allerdings führt die Anregung mit Isoproterenol dafür zu einer ca. 1,5-mal größeren Amplitude ($7.1\% \pm 0.22\%$) gegenüber der elektrischen Feldstimulation (Amplitude $4.66\% \pm 0.61\%$, vgl. Abb. 34).

Vergleicht man die nukleäre Reaktionskinetik (k , Amplitude) der Wildtyp-Zellen (WT) mit der der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A), zeigen sich im Gegensatz zum Zytoplasma keine nennenswerten Unterschiede.

Innerhalb der Wildtyp-Zellen (WT) ist die zytoplasmatische CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit sowohl unter elektrischer Feldstimulation ($k = 2.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 33), als auch unter Isoproterenol ($k = 1.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 33) doppelt so schnell wie die im nukleären Kompartiment ($k = 1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k = 0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 34).

3. Ergebnisse

Bezüglich der CaMKII-Aktivität (Amplitude) lassen sich im Wildtyp zwischen Zytoplasma und Nukleus keine relevanten Unterschiede finden.

In den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) ist die zytoplasmatische CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter elektrischer Feldstimulation ($k=1.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 33) zwar schneller als im Nukleus ($=1.0 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ vgl. Abb. 34), aber im Gegensatz zum Wildtyp sind die k-Konstanten von Zytosol und Nukleus unter Isoproterenol annähernd gleich ($k=0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 33), $k=0.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 34)).
Bezüglich der CaMKII-Aktivität (Amplitude) lassen sich auch bei den nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) keine relevanten Unterschiede zwischen Zytoplasma und Nukleus finden.

Zusammenfassend lässt sich beobachten, dass die Hemmung der Autophosphorylierung vor allem für die β -adrenerge CaMKII-Stimulation mit Isoproterenol und für das zytoplasmatische Zellkompartiment von Relevanz zu sein scheint.

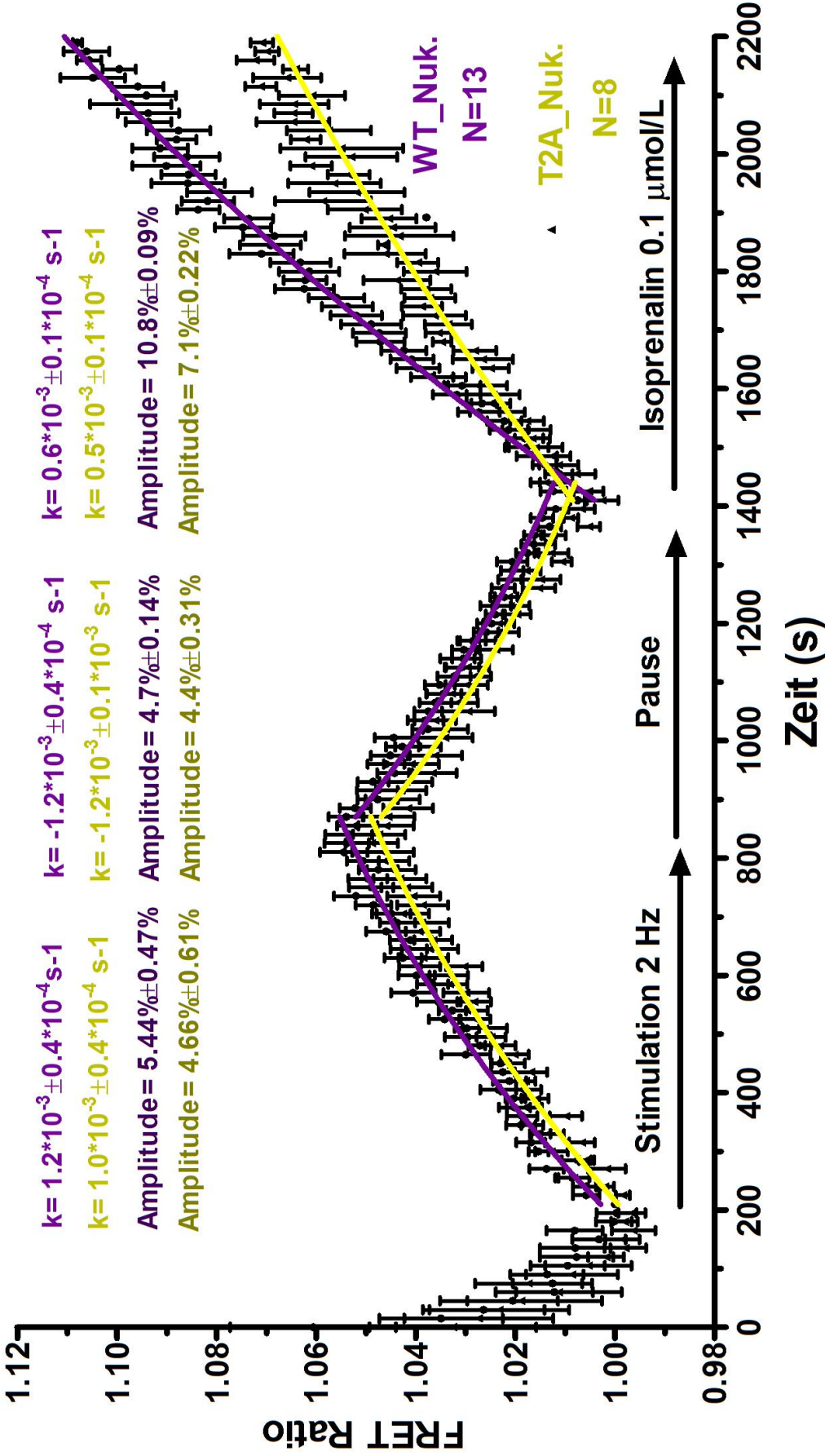


Abbildung 34 Gegenüberstellung von WT- und T2A-Kardiomyozyten im nukleären Kompartiment.

Die FRET Ratio wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Untersucht wurden Ratten-Kardiomyozyten (48 h Kultur; WT N=13; T2A N=8), Elektrische Stimulation (2Hz, 20V) von 200s - 800s; Pharmakologisch (Iso 10^{-7}mol/L) von 1400s - 2200s; Ruhephase von 800s - 1400s.

3.3.5 Statistische Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten k

Zur genaueren Untersuchung des CaMKII-Reaktionsverhaltens wurden die Geschwindigkeitskonstanten k und die Amplituden in uni- und bidirektionalen Varianzanalysen (One-/Two-WAY-ANOVA) mit Post-Hoc-Test Holm-Sidak ($p < 0.05$) statistisch gegenübergestellt. Untersucht wurden die kinetischen Parameter der Wildtyp-Zellen (WT) und der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) im Zytoplasma und im Nukleus. Die Stimulation erfolgte entsprechend dem oben beschriebenen Versuchsalgorithmus (vgl. 3.3.1).

Abb. 35 zeigt die Varianzanalyse der Geschwindigkeitskonstante k für die Aktivitätsentwicklung unter elektrischer Feldstimulation und unter Isoproterenol für die Wildtyp-Zellen (WT) und die Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A). Es wurden jeweils beide Zellkompartimente (Zytosol und Nukleus) berücksichtigt.

Die größte Geschwindigkeitskonstante k findet sich im Zytoplasma der Wildtyp-Zellen (WT) unter elektrischer Feldstimulation. Die CaMKII-Aktivierung läuft unter diesen Bedingungen offenbar signifikant schneller ab als unter Stimulation mit Isoproterenol oder als im nukleären Zellkompartiment des Wildtyp (* in Abb. 35). Entsprechend sind die Verhältnisse unter Stimulation mit Isoproterenol: Im Zytosol der Wildtyp-Zellen (WT) verläuft die Aktivierung signifikant schneller als im Zytosol der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) und auch schneller als im Nukleus der Wildtyp-Zellen (WT) († in Abb. 35).

Die Verhältnisse in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante sind ähnlich: Die elektrisch getriggerte CaMKII-Aktivierung im Zytoplasma der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten ist signifikant schneller als im Nukleus und auch als im Zytoplasma der die CaMKII-Mutante exprimierenden Zellen unter Stimulation mit Isoproterenol (# in Abb. 35). Allerdings ist die zytoplasmatische Enzymaktivierung der nicht autophosphorylierungsfähigen Zellen (T2A) trotzdem signifikant langsamer als die im Zytoplasma der Wildtyp-Kardiomyozyten (WT) und zwar sowohl unter elektrischer Feldstimulation (* in Abb. 35) als auch unter Anregung mit Isoproterenol (vgl. Abb. 35).

Im nukleären Zellkompartiment ist die Aktivierung unter elektrischer Feldstimulation sowohl in den Wildtyp- (WT) als auch in den nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) signifikant schneller als unter Anregung mit Isoproterenol (vgl. Abb. 35). Allerdings zeigen sich in den Zellkernen keine signifikanten Geschwindigkeitsunterschiede zwischen dem Wildtyp und Zellen mit der CaMKII-Mutante.

Auch zeigen sich in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Gegensatz zum Wildtyp (WT) keine signifikanten k -Unterschiede zwischen Zytosol und Zellkern.

3. Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bezüglich der Geschwindigkeitskonstante k ein Gefälle zwischen Zytoplasma und Nukleus, zwischen elektrischer Feldstimulation und Anregung mit Isoproterenol sowie zwischen Wildtyp (WT) und nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) besteht. Unter elektrischer Feldstimulation und unter Isoproterenol zeigen sich die gleichen Signifikanz-Unterschiede mit der Ausnahme, dass sich in den Wildtyp-Zellen im Gegensatz zu denen mit der CaMKII-Mutante (T2A) ein Signifikanz-Unterschied zwischen Zytoplasma und Nukleus unter Isoproterenol findet († in Abb. 35).

Die Hemmung der Autophosphorylierung reduziert demnach die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit sowohl unter elektrischer Feldstimulation als auch unter β -adrenerger Stimulation, aber interessanterweise nur im Zytoplasma. Im Nukleus scheint die Aktivierungsgeschwindigkeit unabhängig von der Autophosphorylierung erniedrigt zu sein, da sich ein Signifikanz-Unterschied zwar zwischen subzellulären Zellkompartimenten innerhalb der Wildtyp-Zellen (WT) und innerhalb der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A), aber nicht zwischen dem Wildtyp und der die CaMKII-Mutante exprimierenden Kardiomyozyten finden lässt.

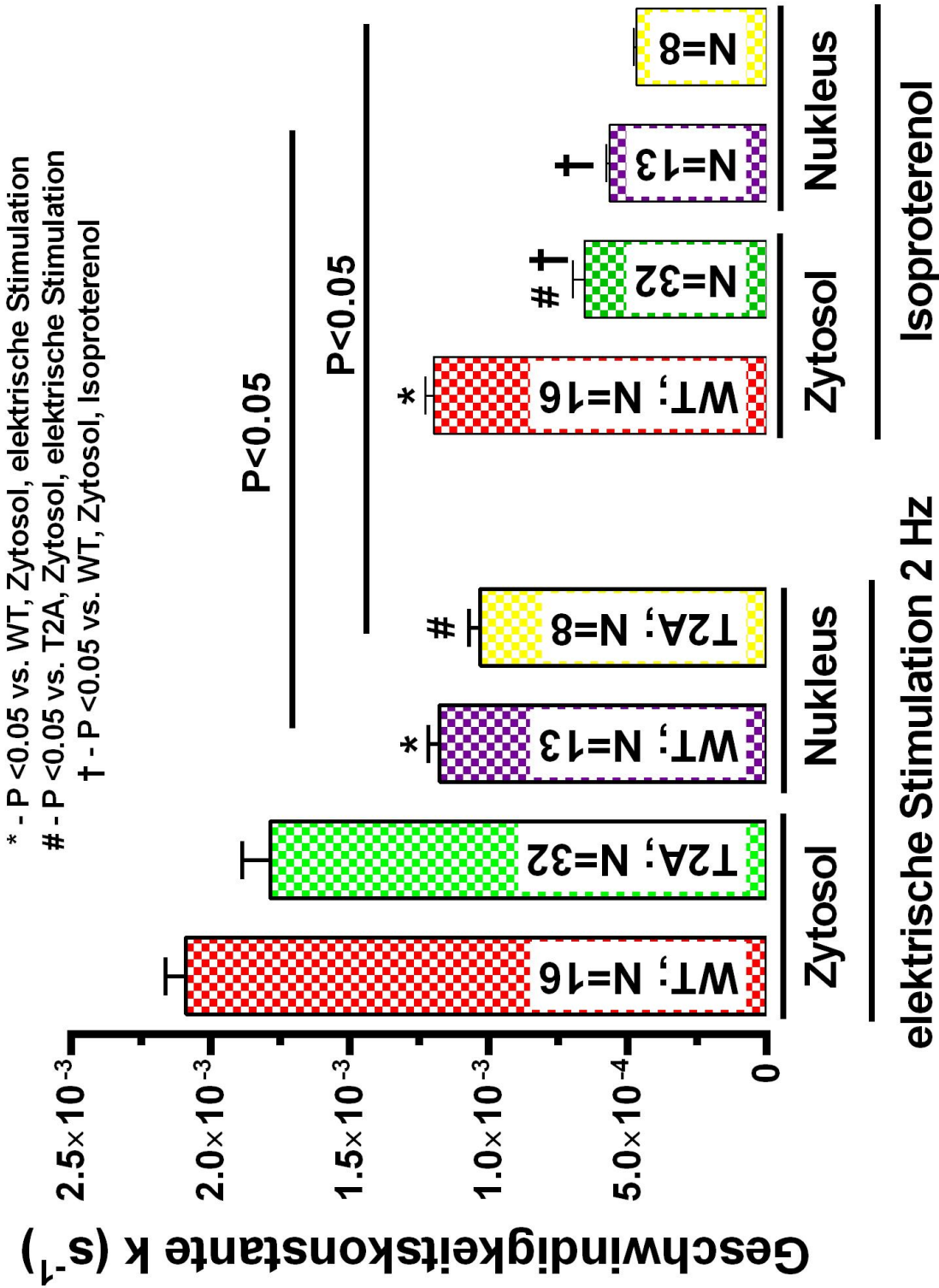


Abbildung 35 Two-Way-ANOVA der Geschwindigkeitskonstante k der Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma und im Nukleus (Versuchsalgorithmus vgl. 3.3.1). Durchgeführt wurde eine bidirektionale Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Hoc-Test Holm-Sidak (p<0.05).

3.3.6 Statistische Gegenüberstellung der Amplituden

Abb. 36 zeigt die statistische Gegenüberstellung der Amplituden (Versuchsalgorithmus 3.3.1).

Im Gegensatz zur Geschwindigkeitskonstante k (vgl. Abb. 35) findet sich die größte Enzymaktivität nicht unter elektrischer Feldstimulation, sondern unter Anregung mit Isoproterenol:

Die Isoproterenol getriggerte CaMKII-Aktivität im Zytosol der Wildtyp-Zellen (WT) ist signifikant größer als die zytoplasmatische Enzymaktivität im Wildtyp (WT) und in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter elektrischer Feldstimulation (* in Abb. 36). Sie ist außerdem signifikant größer als die zytoplasmatische Enzymaktivität der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) unter Isoproterenol (* in Abb. 36).

Ähnliches ist im nukleären Kompartiment zu beobachten: Die Isoproterenol-assoziierte CaMKII-Aktivität im Zellkern des Wildtyps übersteigt die nukleären Amplituden von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter elektrischer Feldstimulation in signifikantem Ausmaß (# in Abb. 36).

Interessanterweise existieren bezüglich der Enzymaktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen Zytoplasma und Nukleus, weder zwischen Wildtyp (WT) und Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) noch zwischen elektrischer Feldstimulation und Anregung mit Isoproterenol.

Auch lassen sich im Gegensatz zum Wildtyp (WT) keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zwischen den subzellulären Kompartimenten (Zytoplasma und Nukleus) der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) finden.

Zusammenfassend betrachtet besteht eine Tendenz zu größerer Enzymaktivität in Wildtyp (WT) gegenüber den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) und im Zytoplasma gegenüber dem nukleären Zellkompartiment. Die gegenüber WT verminderte Aktivität im Zytoplasma der T2A-Kardiomyozyten ist vereinbar mit Untersuchungsergebnissen aus früheren Experimenten (Erickson et al. 2011b).

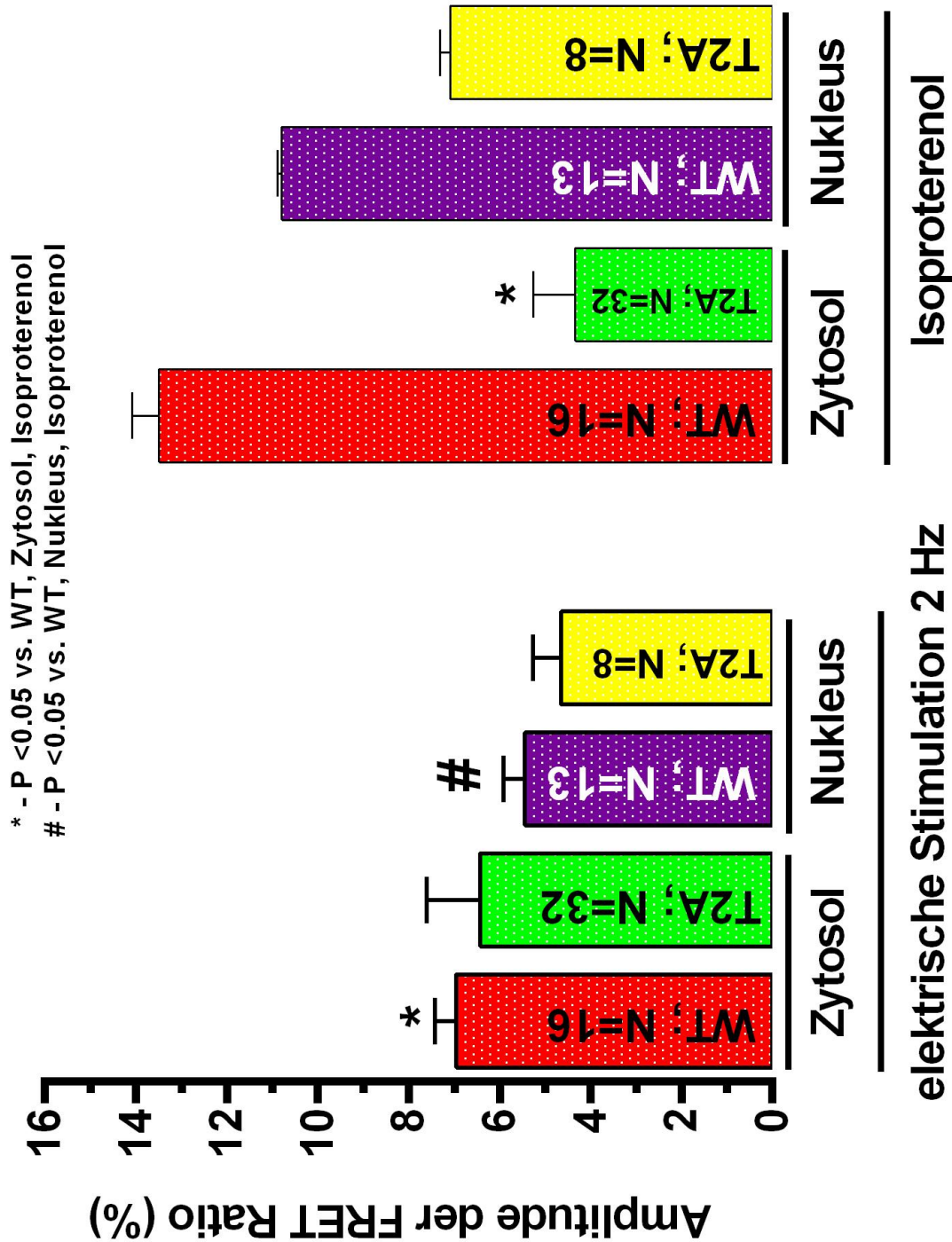


Abbildung 36 Two-Way-ANOVA der Amplitude der Wildtyp-Zellen (WT) und der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante im Zytoplasma und im Nukleus (Versuchsalgorithmus vgl. 3.3.1). Durchgeführt wurde eine bidirektionale Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Hoc-Test Holm-Sidak ($p < 0.05$).

3.4 Kombinierte Anregung mit elektrischer Feldstimulation und mit Isoproterenol zur pharmakologischen Stimulation der β -Rezeptoren

3.4.1 Der Versuchsalgorithmus

Die gesteigerte CaMKII-Expression/-Aktivität bei Herzinsuffizienzpatienten ist assoziiert mit einer chronischen β -adrenergen Stimulation (Grimm und Brown 2010). Die Rolle der Autophosphorylierung ist dabei von besonderem Interesse. *In vitro* kann zur β -adrenergen CaMKII-Aktivierung das β -selektive Adrenalinderivat Isoproterenol genutzt werden (vgl. 3.3.1). Isoproterenol zeigt gegenüber anderen neurohumoralen Stimulanzen eine langsamere, aber stärkere Enzymaktivierung, die sich durch gleichzeitige elektrische Feldstimulation beschleunigen lässt (Erickson et al. 2011b). Zur Untersuchung dieser kombinierten Stimulation wurden in der folgenden Versuchsreihe Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der autophosphorylierungsunfähigen CaMKII-Mutante (T2A) über einen Zeitraum von insgesamt 30 Minuten beobachtet: Die ersten drei Minuten dienten der Vermeidung von Bleaching-Artefakten. Anschließend wurden die Zellen der kombinierten Stimulation für 10 Minuten ausgesetzt. Nach Beendigung der elektischen Feldstimulation (810s) wurde die pharmakologische Anregung für weitere 16,5 Minuten fortgesetzt. Die Messungen erfolgten kontinuierlich mit Lichtanregung und Bildaufnahme alle 15 Sekunden. Ausgewertet wurden zytoplasmatische und nukleäre Kompartimente.

3.4.2 Originalregistrierung im Zytoplasma (Wildtyp (WT))

Anhand der Originalregistrierung (Abb. 37) lässt sich der Reaktionsverlauf während des oben beschriebenen Versuchsalgorithmus beispielhaft nachvollziehen (WT; N=1; Zytoplasma):

Die Stimulation (210-810s) führt zu einem kontinuierlichen, exponentiellen Aktivitätsanstieg ($f(x)=Y_0+(Plateau-Y_0)*(1-e^{k*x})$). Nach Beendigung der elektrischen Feldstimulation bildet sich ein Plateau mit einer über den weiteren Beobachtungszeitraum annähernd konstanten Enzymaktivität. Eine Aktivitätsrückbildung wie unter alleiniger elektrischer Stimulation (vgl. 3.3) bleibt aus. Allerdings führt die alleinige pharmakologische Stimulation auch zu keinem weiteren Aktivitätsanstieg mehr. Es zeigen sich eine Geschwindigkeitskonstante von $k=3.1*10^{-3}\pm 0.18*10^{-3} s^{-1}$ und eine maximale Amplitude von 34.33%.

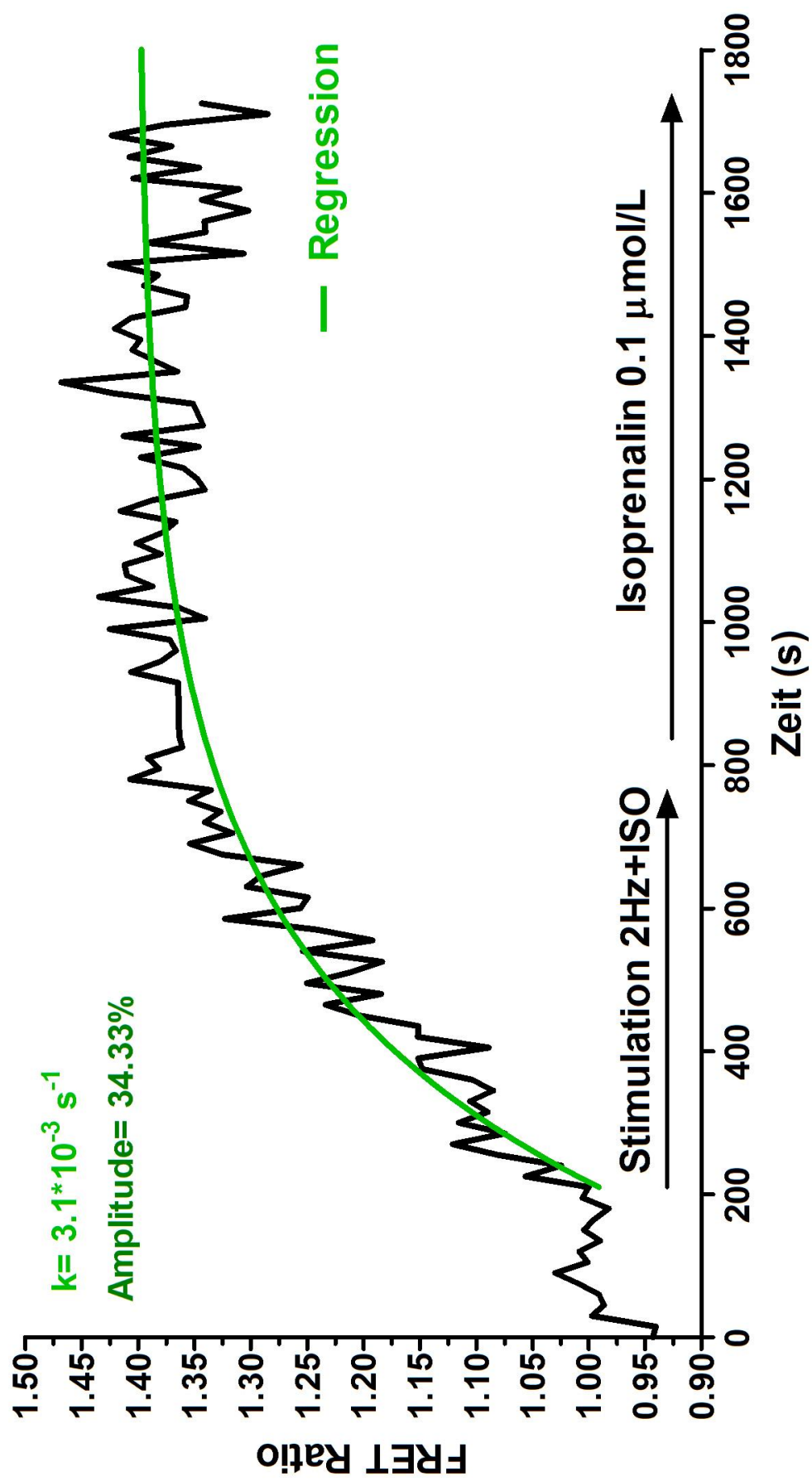


Abbildung 37 Originalregistrierung unter kombinierter elektrischer Feldstimulation und pharmakologischer Anregung der β -Rezeptoren im Zytosol (Wildtyp; N=1).

3.4.3 Gegenüberstellung von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma

Der Reaktionsverlauf im Zytoplasma der Wildtyp- (WT-) Kardiomyozyten (Abb. 38) entspricht in etwa dem der Originalregistrierung (Abb. 37):

Die Kombination aus elektrischer Feldstimulation und pharmakologischer Stimulation mit Isoproterenol führt im Wildtyp zu einem kontinuierlichen exponentiellen Aktivitätsanstieg ($f(x)=Y_0+(Plateau-Y_0)*(1-e^{k*x})$). Auch nach Beendigung der elektrischen Feldstimulation bleibt die Aktivität auf einem konstanten Level mit einem Aktivitätsmaximum (Amplitude $33.41\% \pm 1.11\%$) das dem der Originalregistrierung annähernd entspricht (Amplitude 34.33%). Zu einer Aktivitätsrückbildung kommt es während des Beobachtungszeitraumes nicht. Die Aktivierungsgeschwindigkeit ist mit $k=2.4*10^{-3} \pm 8.5*10^{-5} \text{ s}^{-1}$ etwas langsamer als die der Originalregistrierung ($k=3.1*10^{-3} \pm 0.8*10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Auch im Zytoplasma der die CaMKII-Mutante exprimierenden Kardiomyozyten (T2A) ist während des Versuchsalgorithmus (vgl. 3.4.1) ein exponentieller Anstieg der Enzymaktivität ohne Aktivitätsrückbildung zu beobachten (vgl. Abb. 38). Der Graph kann mit der exponentiellen Regressionsgleichung $f(x)=Y_0+(Plateau-Y_0)*(1-e^{k*x})$ charakterisiert werden. Allerdings ist die Amplitude in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) mit $13.78\% \pm 0.64\%$ ca. 2,5 Mal niedriger als im Wildtyp ($33.41\% \pm 1.11\%$). Die Enzymaktivierung im Wildtyp-Zytoplasma ist etwas schneller als die im Zytoplasma der Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) (k in WT $2.4*10^{-3} \pm 8.5*10^{-5} \text{ s}^{-1}$ gegenüber k in T2A $k=1.9*10^{-3} \pm 5.7*10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

Zusammengefasst führt die Hemmung der Autophosphorylierung im Zytoplasma zu einer dezent verlangsamten CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) und zu einer deutlichen Verminderung der Enzymaktivität (Amplitude).

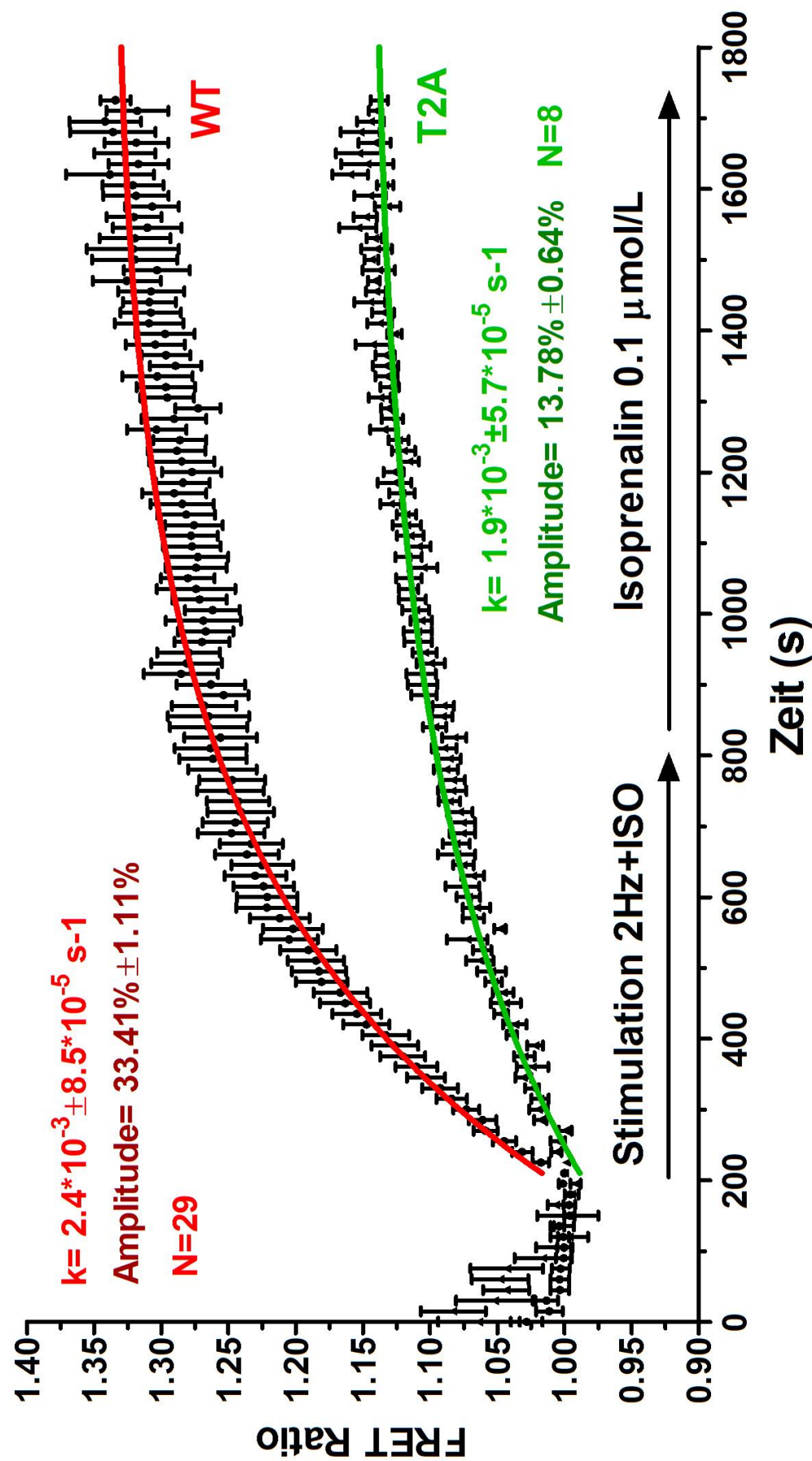


Abbildung 38 Gegenüberstellung der Reaktionskinetik von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) im Zytoplasma.

Das FRET-Signal wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit bei 210s auf 1 normiert. Untersucht wurden Ratten-Kardiomyozyten (Ad-Camuia; 48h Kultur; WT N=29; T2A N=8). Der Versuchsalgorithmus entspricht 3.4.1.

3.4.4 Gegenüberstellung von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Nukleus

Die nukleären Reaktionsverläufe entsprechen sowohl in den Wildtyp-Zellen (WT) als auch in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) (Abb. 39) denen im Zytoplasma (Abb. 38): Der kontinuierliche Aktivitätsanstieg kann mit der exponentiellen Funktionsgleichung $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - e^{-k * x})$ charakterisiert werden. Es kommt zu keiner Aktivitätsrückbildung, vielmehr erreicht die Aktivität einen konstanten Level.

Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit ist im Nukleus der Wildtyp-Zellen (WT) und der Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante beinhalten annähernd gleich (k in WT $1.6 * 10^{-3} \pm 4.0 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, k in T2A $1.5 * 10^{-3} \pm 4.2 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ vgl. Abb. 39).

Dafür ist die nukleäre CaMKII-Aktivität (Amplitude) in den Wildtyp-Zellen (WT) fast zweimal größer als in den Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) (Amplitude WT $19.89\% \pm 0.97\%$, Amplitude T2A $10.08\% \pm 0.56\%$, vgl. Abb. 39).

Innerhalb der Wildtyp-Zellen (WT) zeigt sich im Zytoplasma eine ca. 1,5-mal schnellere CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit ($k = 2.4 * 10^{-3} \pm 8.5 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 38) und eine ca. 1,7-mal größere CaMKII-Aktivität (Amplitude $33,41\% \pm 1.11\%$, Abb. 38) gegenüber dem nukleären Kompartiment ($k = 1.6 * 10^{-3} \pm 4.0 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, Amplitude $19.89\% \pm 0.97\%$, vgl. Abb. 39).

In den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante finden sich allenfalls marginale Unterschiede zwischen Zytoplasma und Nukleus, sowohl für die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k im Zytosol $1.9 * 10^{-3} \pm 5.7 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, k im Nukleus $1.5 * 10^{-3} \pm 4.2 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) als auch für die CaMKII-Aktivität (Amplitude im Zytosol $13.78\% \pm 0.64\%$, Amplitude im Nukleus $10.08\% \pm 0.56\%$, vgl. Abb. 38 und 39).

In Prozent ausgedrückt ist das nukleäre CaMKII-Aktivitätsausmaß (Amplitude) im Wildtyp um ca. 40% gegenüber dem zytoplasmatischen CaMKII-Aktivitätsausmaß (Amplitude) reduziert. In den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante beträgt der Unterschied zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Amplitude lediglich 26,84%. Daraus resultiert im Vergleich Wildtyp gegenüber Kardiomyozyten mit CaMKII-Mutante, dass die Wildtyp-Amplitude im Zytosol 2,5 mal so groß ist wie die der die CaMKII-Mutante exprimierenden Zellen, im Nukleus allerdings nur annähernd doppelt so groß.

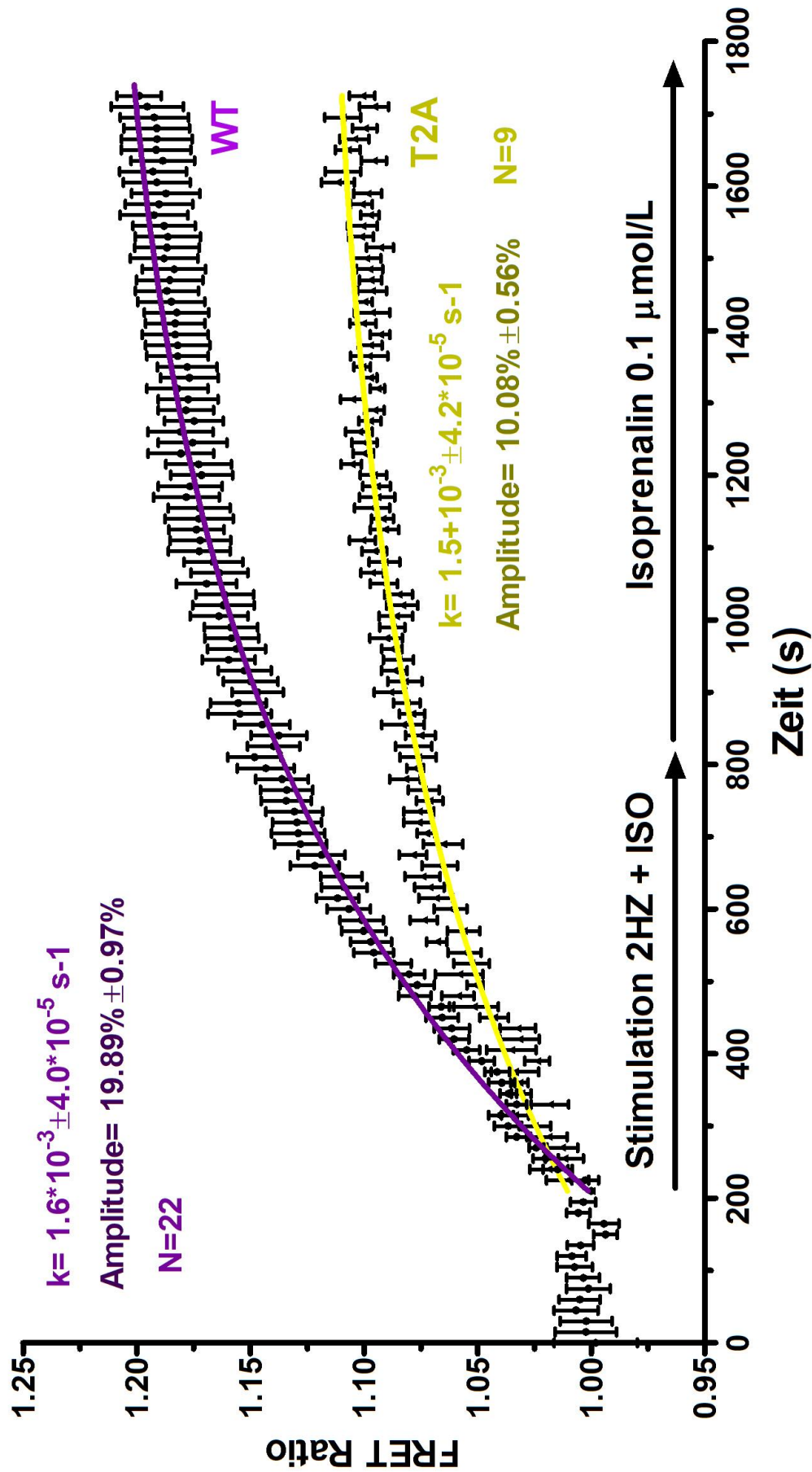


Abbildung 39 Gegenüberstellung der Reaktionskinetik von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante im Zytoplasma.

Das FRET-Signal wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Der Versuchsalgorithmus entspricht 3.4.1. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit bei 210s auf 1 normiert. Untersucht wurden Ratten-Kardiomyozyten (Ad-Camuia; 48h Kultur; WT N=22; T2A N=9).

3.4.5 Statistische Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten k

Zur differenzierteren Analyse wurden die Geschwindigkeitskonstanten (k) der Wildtyp-Zellen (WT) und die der Zelle die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) (Versuchsalgorithmus 3.4.1) mittels bidirektionaler Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test Holm-Sidak ($p < 0.05$) auch statistisch ausgewertet. Beide Zellkompartimente (Zytoplasma und Nukleus) wurden berücksichtigt (vgl. Abb. 40).

Unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol ist die zytoplasmatische Enzymaktivierung im Wildtyp ($k = 2.4 \cdot 10^{-3} \pm 8.5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) signifikant schneller als im Wildtyp-Nukleus (* in Abb. 40), allerdings nicht signifikant schneller als im Zytoplasma der Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A).

Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit im Zytoplasma der nichtautophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) ist signifikant schneller als im Nukleus (# in Abb. 40).

Die Nuklei der Wildtyp-Zellen (WT) und der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) zeigen bezüglich der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) keinen Signifikanzunterschied.

Um die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten (k) unter den Bedingungen der Versuchsalgorithmen 3.3.1 und 3.4.1 miteinander zu vergleichen sind in Abb. 40 zusätzlich zu den k-Werten unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol (Versuchsalgorithmus 3.4.1) auch die unter alleiniger Anregung mit elektrischer Feldstimulation und unter alleiniger pharmakologischer Stimulation mit Isoproterenol aufgeführt (vgl. Abschnitt 3.3, Abb. 35 und Versuchsalgorithmus 3.3.1).

Die zytoplasmatische CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) ist beim Wildtyp (WT) unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol ($k = 2.4 \cdot 10^{-3} \pm 8.5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) zwar signifikant schneller als unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol ($k = 1.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (* in Abb. 40), aber nicht schneller als unter alleiniger Anregung mit elektrischer Feldstimulation ($k = 2.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Das gleiche gilt für das nukleäre Kompartiment der Wildtyp-Zellen (WT):

Die k-Konstante ist unter kombinierter Anregung signifikant schneller gegenüber der alleinigen Stimulation mit Isoproterenol († in Abb. 40), aber nicht gegenüber der alleinigen Anregung mit elektrischer Feldstimulation.

Die zytoplasmatische CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) der Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) ist unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol (Versuchsalgorithmus 3.4.1) signifikant schneller als die unter

3. Ergebnisse

alleiniger Stimulation mit Isoproterenol (# in Abb. 40), aber nicht signifikant schneller als unter alleiniger elektrischer Feldstimulation.

Ähnlich wie beim Wildtyp (WT) zeigt sich im Nukleus von Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol eine signifikant schnellere CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) gegenüber der alleinigen Stimulation mit Isoproterenol (§ in Abb. 40), aber nicht gegenüber der alleinigen Anregung mit elektrischer Feldstimulation.

Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten von Wildtyp-Zellen (WT) mit denen von Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) bzw. die Geschwindigkeitskonstanten von Zytosol und Nukleus bezogen auf die drei unterschiedlichen Stimulationsarten finden sich interessante Parallelen zwischen den Versuchsalgorithmen 3.3.1 und 3.4.1:

Für alle Versuchsalgorithmen gilt, dass die Enzymaktivierung im Wildtyp (WT) schneller ist als in den Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) und zwar sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma. Zusätzlich ist die Aktivierung im Zytoplasma immer schneller als die im Nukleus (vgl. Abb. 40), auch wenn nicht alle Unterschiede signifikant sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die CaMKII-Aktivierung unter elektrischer Feldstimulation schneller ist als unter Anregung mit Isoproterenol. Durch Kombination der elektrischen Feldstimulation und der β -adrenergen Anregung mittels Isoproterenol lässt sich die Aktivierungsgeschwindigkeit noch weiter steigern. Dies gilt sowohl für die Wildtyp-Zellen (WT) als auch für die Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) und für beide Zellkompartimente (Zytoplasma und Nukleus).

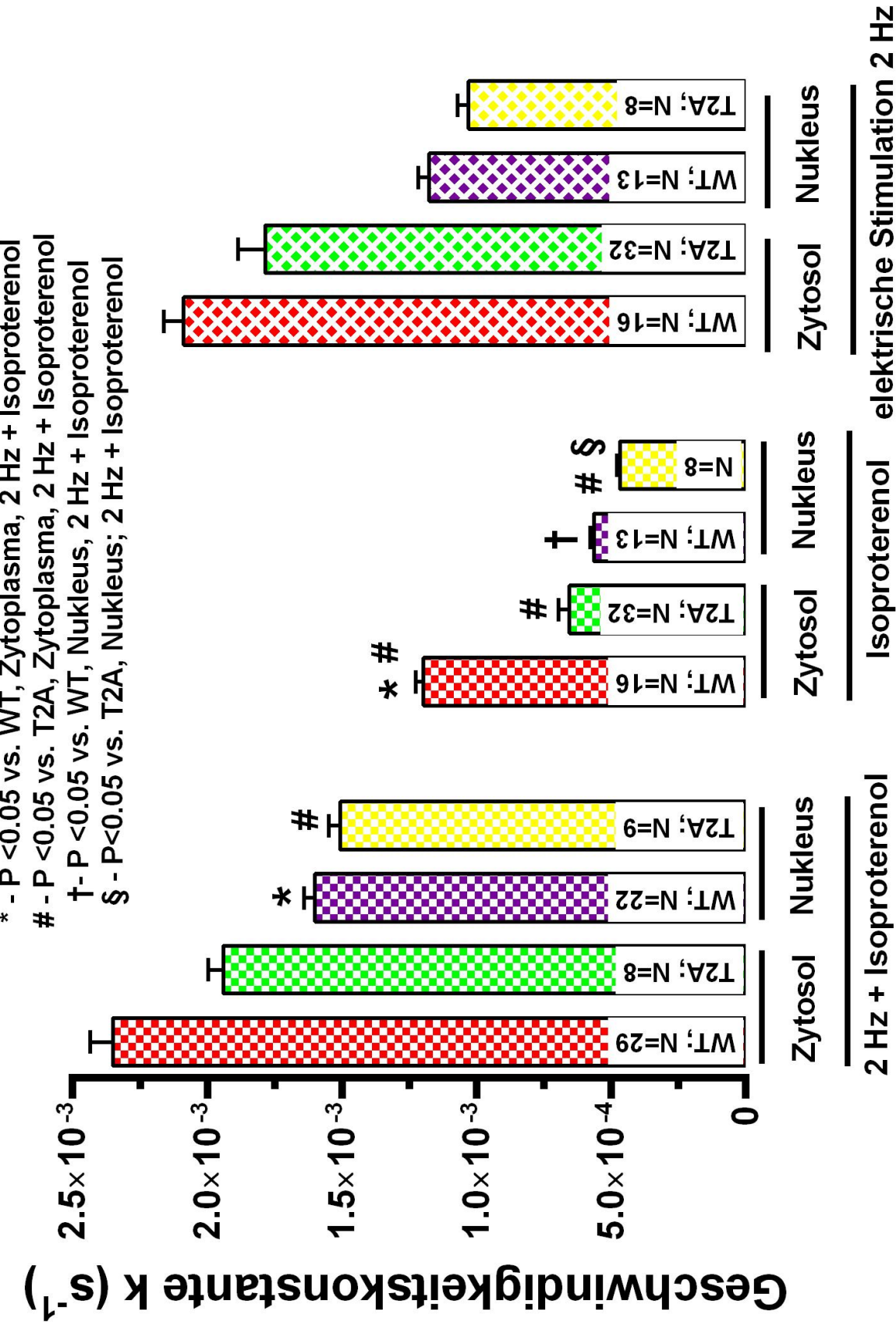


Abbildung 40 Two-Way-ANOVA der Geschwindigkeitskonstante k von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) in Zytoplasma und Nukleus unter kombinierter (3.4.1) , unter alleiniger elektrischer Feldstimulation (2Hz, 20 mV) und unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol (3.3.1).

3.4.6 Statistische Gegenüberstellung der Amplituden

Abb. 41 zeigt die Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivität (Amplituden) von Wildtyp-Zellen (WT) und von den Kardiomyozyten die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und mit Isoproterenol (Versuchsalgorithmus 3.4.1). Verglichen wurden sowohl die zytoplasmatischen als auch die nukleären Zellkompartimente.

Unter kombinierter Stimulation mit 2 Hz und Isoproterenol zeigt sich die größte Enzymaktivität im Zytoplasma der Wildtyp-Zellen (WT). Die dort gemessene Amplitude ist mit $33.41\% \pm 1.11\%$ signifikant größer als die im Nukleus der Wildtyp-Zellen (Amplitude $19.89\% \pm 0.97\%$) und als die in den Zellkompartimenten der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) (Zytoplasma $13.78\% \pm 0.64\%$; Nukleus $10.08\% \pm 0.56\%$) (* in Abb. 41).

Zwischen den Kompartimenten der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) existieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CaMKII-Aktivität. Allerdings ist die nukleäre Amplitude der Wildtyp-Zellen (WT) signifikant größer als die im Nukleus von Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) (# Abb. 41).

Zusätzlich wurden die Amplituden unter kombinierter Stimulation mit denen unter alleiniger elektrischer Feldstimulation und mit denen unter alleiniger Anregung mittels Isoproterenol (vgl. Abschnitt 3.3, Abb. 24 und Versuchsalgorithmus 3.3.1) verglichen (Abb. 41). Auch bei diesem Vergleich wurden beide Zellkompartimente berücksichtigt.

Die zytosolische CaMKII-Aktivität der Wildtyp-Zellen ist unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol signifikant größer als unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol und auch als unter alleiniger Anregung mit elektrischer Feldstimulation (* in Abb. 41).

Ebenso ist die zytoplasmatische Amplitude der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol signifikant größer als unter alleiniger elektrischer Feldstimulation und unter alleiniger Anregung mit Isoproterenol († in Abb. 41).

Auch die nukleäre CaMKII-Aktivität ist im Wildtyp unter kombinierter Stimulation signifikant größer als unter alleiniger Anregung mit elektrischer Feldstimulation und unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol (# in Abb. 41).

Dies gilt allerdings nicht für die Nuklei der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A): Unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol zeigt sich

3. Ergebnisse

bezüglich der CaMKII-Aktivität kein signifikanter Unterschied gegenüber der alleinigen Stimulation mit 2 Hz oder Isoproterenol.

Vergleicht man die CaMKII-Aktivitäten der drei unterschiedlichen Stimulations-Modi (vgl. Versuchsalgorithmus 3.3.1 und Versuchsalgorithmus 3.4.1) miteinander, fällt auf, dass sich die niedrigsten Amplituden unter alleiniger elektrischer Feldstimulation zeigen. Die nächstgrößeren Amplituden lassen sich unter alleiniger Anregung mit Isoproterenol messen. Die größten Amplituden zeigen sich unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol. Dies gilt sowohl für Wildtyp-Zellen (WT) als auch für Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) und für beide Kompartimente (Zytoplasma und Nukleus).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die CaMKII-Aktivitäten in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter kombinierter Stimulation (Zytosol-Amplitude $13.78\% \pm 0.64\%$; Nukleus-Amplitude $10.08\% \pm 0.56\%$) nahezu denen in den Wildtyp-Zellen (WT) unter alleiniger Anregung mit Isoproterenol (Zytosol-Amplitude $13.5\% \pm 0.59\%$; Nukleus-Amplitude $10.8\% \pm 0.09$) entsprechen (vgl. Abb. 33, 34, 38, 39 und 41).

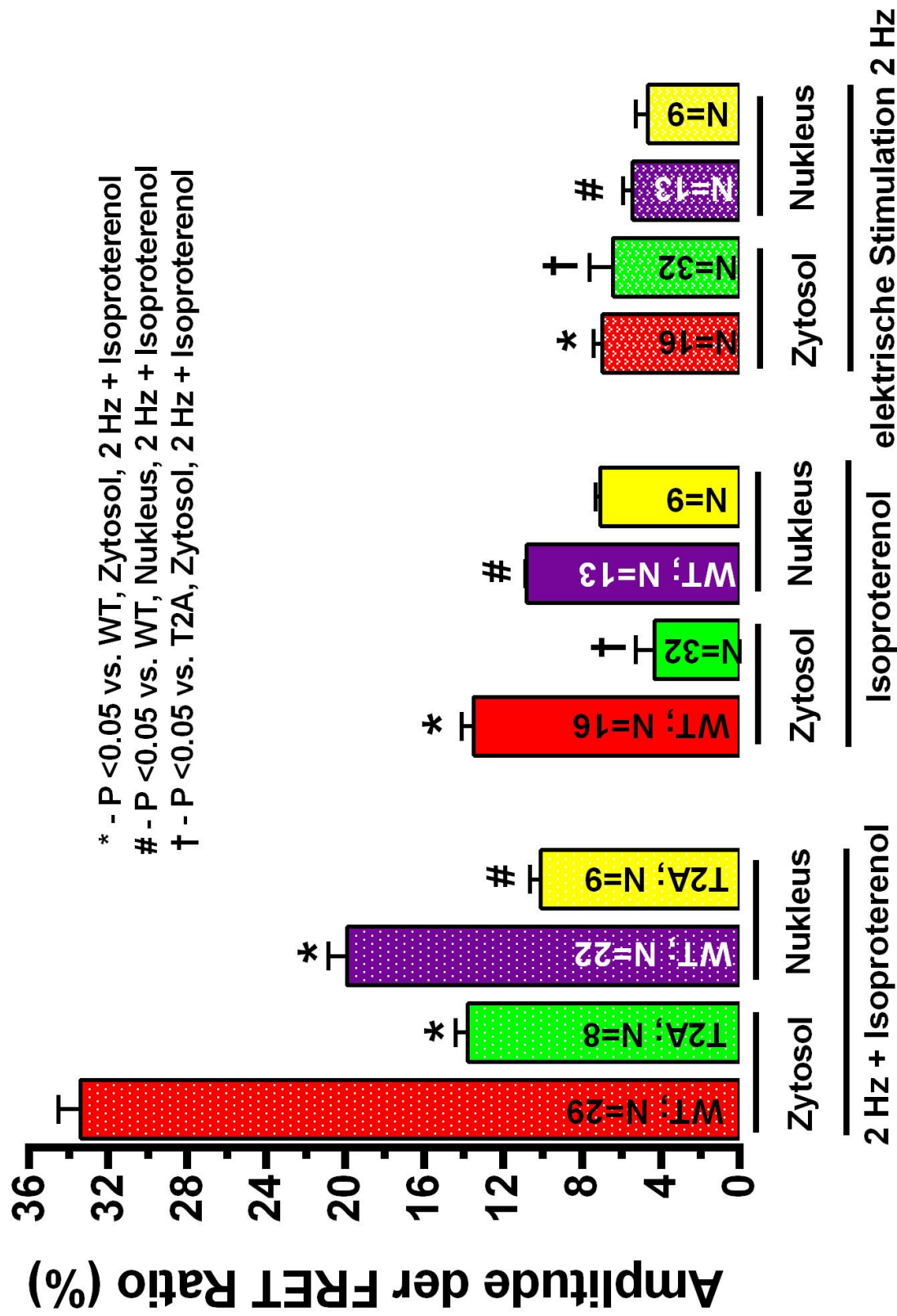


Abbildung 41 Two-Way-ANOVA der Amplituden von Wildtyp-Zellen und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) in Zytosol und Nukleus unter kombinierter (3.4.1), unter alleiniger elektrischer Feldstimulation (2Hz, 20 mV) und unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol (3.3.1).

3.5 Stimulation mit Angiotensin II (ANGII)

3.5.1 Der Versuchsalgorithmus

Als Ursache der pathologisch gesteigerten CaMKII-Expression und CaMKII-Aktivität bei Herzpathologien wird neben der chronischen β -Aktivierung auch eine Beteiligung des RAAS (vgl. 1.3.5) vermutet (Grimm und Brown 2010; Velez Rueda et al. 2012; Wagner et al. 2014). Allerdings ist die Einflussnahme der beiden Reizsysteme auf die CaMKII unterschiedlich: Während die β -adrenerge Stimulation über die Adenylatzyklase und cAMP zur Autophosphorylierung von Threonin 286 führt (vgl. 1.3.4 und 1.5.4), wird vermutet, dass Angiotensin II (ANGII) via NOX2 und ROS (vgl. 1.4) eine oxidative Aktivierung über die Aminosäurereste Methionin 280/81 vermittelt (Erickson et al. 2008; Erickson 2014; Wagner et al. 2014).

Zur genaueren Untersuchung der noch weitestgehend ungeklärten Angiotensin II-assoziierten oxidativen CaMKII-Aktivierung wurden Wildtyp-Kardiomyozyten (WT) über einen Zeitraum von 30 Minuten epifluoreszenzmikroskopisch untersucht. Während dieses Beobachtungszeitraums erfolgte eine zehnminütige Stimulation mit Angiotensin II (ANGII; 1 μ M) in Kombination mit dem spezifischen NOX2-Hemmstoff gp91-ds-tat (ds-TAT; 20 μ M) (vgl. 1.4.5). Als Negativkontrolle dienten Wildtyp-Zellen (WT), die mit Angiotensin II (ANGII; 1 μ M) und dem Kontrollprotein Scramble (SC; 20 μ M) (vgl. 2.7.3) angeregt wurden. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Kardiomyozyten für 16.5 Minuten weiter beobachtet.

Um die Beziehung zwischen der Angiotensin II-assoziierten und der β -adrenerg vermittelten Stimulation zu untersuchen, wurden auch Kardiomyozyten mit der autophosphorylierungsunfähigen CaMKII-Mutante (T2A, vgl. 2.3.2) nach dem oben beschriebenen Algorithmus stimuliert (ANGII + ds-TAT bzw. ANGII + SC).

Alle Messungen erfolgten kontinuierlich mit Lichtanregung und Bildaufnahme alle 15 Sekunden. Ausgewertet wurden zytoplasmatische und nukleäre Kompartimente.

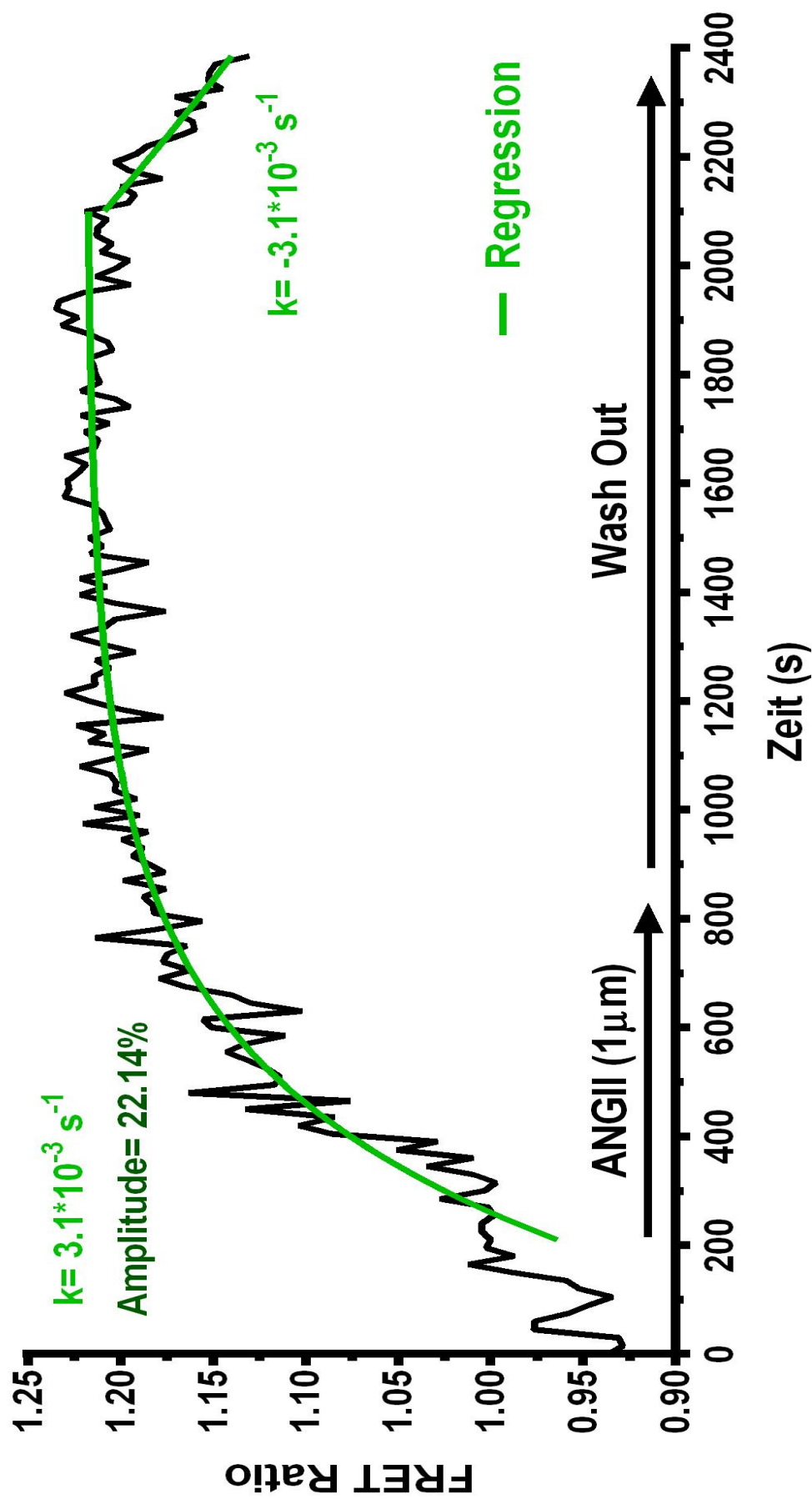


Abbildung 42 Originalregistrierung unter pharmakologischer Stimulation mit ANGI (1 μ M) im Zytoplasma (Wildtyp; N=1). Versuchsalgorithmus 3.5.1 .
Transduktion der WT-Kardiomyozyten mit Ad-Camui α ; Kultivierung über 48 Stunden.

3.5.2 Originalregistrierung im Zytoplasma (Wildtyp (WT))

Die Originalregistrierung umfasst einen Beobachtungszeitraum von 40 Minuten mit dem Ziel, den "physiologischen" Zeitpunkt der Aktivitätsrückbildung (bei ca. 2100s) abzubilden.

Abb. 42 zeigt den physiologischen Reaktionsverlauf unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) im Zytoplasma eines Wildtyp-Kardiomyozyten (N=1):

Unter der pharmakologischen Anregung (210 bis 810s) kommt es zu einem exponentiellen Aktivitätsanstieg ($f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - \exp^{-k \cdot x})$) mit einer maximalen Amplitude von 22.14%. Auch nach dem Auswaschen von Angiotensin II (ANGII) bleibt die Enzymaktivität zunächst auf einem konstanten Level. Erst 1290 Sekunden bzw. 21.5 Minuten nach Stimulationsende zeigt sich bei 2100s eine beginnende Aktivitätsrückbildung ($f(x) = ((Y_0 - \text{Plateau}) \cdot \exp^{-k \cdot X}) + \text{Plateau}$). Die Geschwindigkeit des Aktivitätsanstiegs und der Aktivitätsrückbildung sind in etwa gleich: $k = 3.1 \cdot 10^{-3} \pm 1.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bzw. $k = -3.1 \cdot 10^{-3} \pm 3.2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

3.5.3 Zytoplasmatische Reaktionsverläufe der Wildtyp-Zellen (WT) unter ANGI + Scramble (SC) und unter ANGI + gp91-ds-tat (ds-TAT)

Der zytosolische Reaktionsverlauf der Wildtyp-Kardiomyozyten (WT) (Abb. 43) entspricht sowohl unter Stimulation mit ANGI+SC als auch unter ANGI+ds-TAT annähernd dem der Originalregistrierung (Abb. 42):

Es kommt zu einem exponentiellen Aktivitätsanstieg mit der Funktionsgleichung $f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - \exp^{-k \cdot x})$, der sich auch nach Stimulus-Ende weiter fortsetzt. Ein konstantes Aktivitätsplateau und der Beginn der Aktivitätsrückbildung wie in der Originalregistrierung sind allerdings nicht zu beobachten, weil die Zellen aus Kapazitätsgründen nur bis 1800s untersucht wurden.

Die Anwesenheit des NOX2-Inhibitors ds-TAT führt im Zytoplasma der Wildtyp-Kardiomyozyten (WT) gegenüber der Stimulation mit ANGI+SC fast zu einer Halbierung der Aktivierungsgeschwindigkeit ($k = 1.3 \cdot 10^{-3} \pm 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ gegenüber $k = 0.7 \cdot 10^{-3} \pm 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Darüber hinaus zeigt sich auch die CaMKII-Aktivität unter ANGI+ds-TAT (Amplitude $14.2\% \pm 1.5\%$) gegenüber ANGI+SC (Amplitude $21.1\% \pm 0.8\%$) um ca. ein Drittel vermindert.

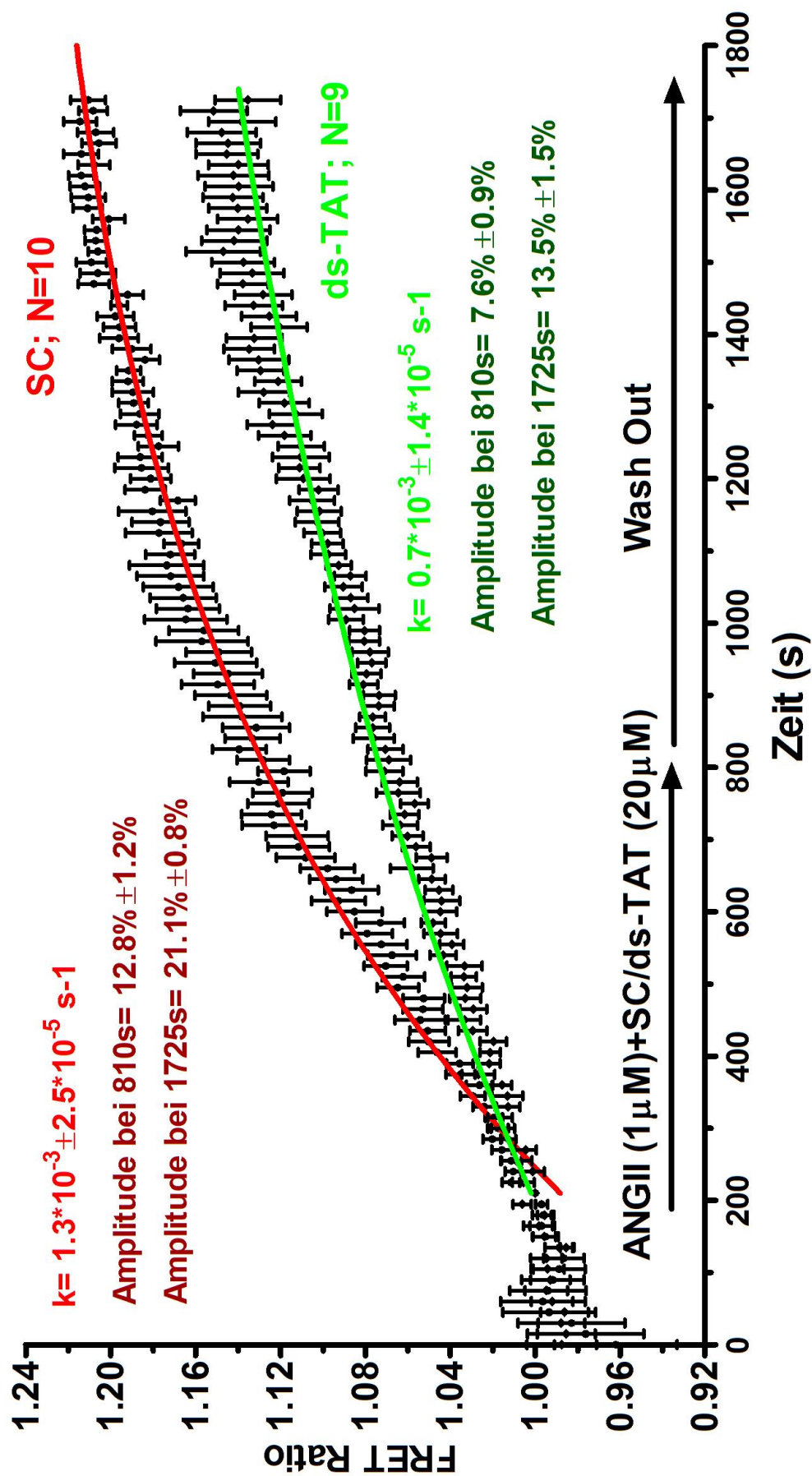


Abbildung 43 Zytoplasmatische Reaktionsverläufe von Wildtyp-Zellen unter ANGII ($1 \mu\text{M}$) in Kombination mit Scramble (SC N=10) und in Kombination mit gp91-ds-tat (ds-TAT N=9). Das FRET-Signal wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die Daten wurden bei 210s auf 1 normiert. Versuchsalgorithmus 3.5.1.

3.5.4 Zytoplasmatische Reaktionsverläufe der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT)

Die zytoplasmatischen Reaktionsverläufe der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) (Abb. 44) weichen unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) (in Kombination mit Scramble (SC) oder gp91-ds-tat (ds-TAT)) deutlich von dem der Originalregistrierung (Abb. 42) ab:

Sowohl unter ANGII+SC, als auch unter ANGII+ds-TAT kommt es während der Stimulation zu einem exponentiellen Aktivitätsanstieg. Die Bildung eines stabilen Aktivitätsplateaus bleibt allerdings aus, weil fast umgehend nach Beendigung der Stimulation (Wash Out) eine Aktivitätsrückbildung zu beobachten ist.

Der Zeitpunkt der beginnenden Aktivitätsrückbildung ist für ANGII+SC und für ANGII+ds-TAT annähernd gleich. Allerdings ist der Aktivitätsanstieg unter Anwesenheit des NOX2-Hemmstoffes (ANGII+ds-TAT) nahezu vollständig reversibel, während die Anwesenheit des Kontrollpeptids (ANGII+SC) nur zu einer beginnenden Aktivitätsrückbildung führt. Der Reaktionsverlauf unter ANGII+ds-TAT zeigt Ähnlichkeiten mit dem unter elektrischer Feldstimulation (vgl. Abb. 33 und 34).

Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten (k) sind in den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) unter Stimulation mit ANGII+ds-TAT ($k=1.5 \cdot 10^{-3} \pm 9.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) und unter Anregung mit SC+ANGII ($k=1.4 \cdot 10^{-3} \pm 6.8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) annähernd gleich schnell (vgl. Abb. 44). Bei der Aktivitätsrückbildung hingegen zeigt sich unter Anwesenheit des NOX-2-Inhibitors (T2A; ANGII+ds-TAT; $k=-1.3 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) eine fast doppelt so große k -Konstante wie unter Anwesenheit des Kontroll-Proteins (T2A; ANGII+SC; $k=-0.7 \cdot 10^{-3} \pm 9.5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Dies ist eine mögliche Erklärung für die fast vollständige Aktivitätsrückbildung unter ANGII+ds-TAT gegenüber ANGII+SC.

Das CaMKII-Aktivitätsausmaß ist in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und dem Nox-2-Inhibitor (ds-TAT) kleiner (Amplitude $11.2\% \pm 1.5\%$) als unter Anregung mit Angiotensin II (ANGII) und dem Kontroll-Peptid (SC) (Amplitude $15.3\% \pm 1.08\%$).

Zusätzlich wurde auch das Reaktionsverhalten der Wildtyp-Zellen (WT) (vgl. Abb. 43) und der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) (vgl. Abb. 44) miteinander verglichen:

Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) der Wildtyp-Zellen (WT) ($k=1.3 \cdot 10^{-3} \pm 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 43) und der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) ($k=1.4 \cdot 10^{-3}$

3. Ergebnisse

$3 \pm 6.8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 44) sind unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und dem Kontroll-Protein (SC) annähernd gleich.

Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) des Wildtyp (WT) ($k = 0.7 \cdot 10^{-3} \pm 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 43) ist unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und dem NOX-2-Inhibitor (ds-TAT) allerdings fast halbiert gegenüber den nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) ($k = 1.5 \cdot 10^{-3} \pm 9.4 \cdot 10^{-5}$, vgl. Abb. 44).

Die CaMKII-Aktivität (Amplitude) ist unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und dem Kontroll-Peptid (SC) im Wildtyp (WT) (Amplitude $21.1\% \pm 0.8\%$, vgl. Abb. 43) größer als in den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) (Amplitude $15.3\% \pm 1.08\%$, vgl. Abb. 44). Auch unter Anregung mit Angiotensin II (ANGII) und dem NOX-2-Inhibitor (ds-TAT) ist die CaMKII-Aktivität im Wildtyp (WT) (Amplitude $14.2\% \pm 1.5\%$, vgl. Abb. 43) stärker ausgeprägt als in den phosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) (Amplitude $11.2\% \pm 1.5\%$, vgl. Abb. 44).

Zusammenfassend vermindert die alleinige Hemmung der NOX2-assoziierten CaMKII-Aktivität (Wildtyp (WT) + ds-TAT) sowohl die enzymatische Aktivierungsgeschwindigkeit (k) als auch das Aktivitätsausmaß (Amplitude).

Die kombinierte Hemmung der NOX2 und der Autophosphorylierung (autophosphorylierungsunfähige Kardiomyozyten (T2A) + ds-TAT) führt zu einer Verminderung des Aktivitätsausmaßes (Amplitude) und beschleunigt die Aktivitätsrückbildung, hat aber offenbar keinen Einfluss auf die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k).

Die alleinige Hemmung der Autophosphorylierung unter Stimulation mit ANGI (autophosphorylierungsunfähige Kardiomyozyten (T2A) + SC) führt ebenfalls zu einer Aktivitätsrückbildung und vermindert auch das Aktivitätsausmaß (Amplitude), aber in geringerem Ausmaß als unter kombinierter Hemmung von NOX2 und Autophosphorylierung. Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) wird ebenfalls nicht beeinflusst.

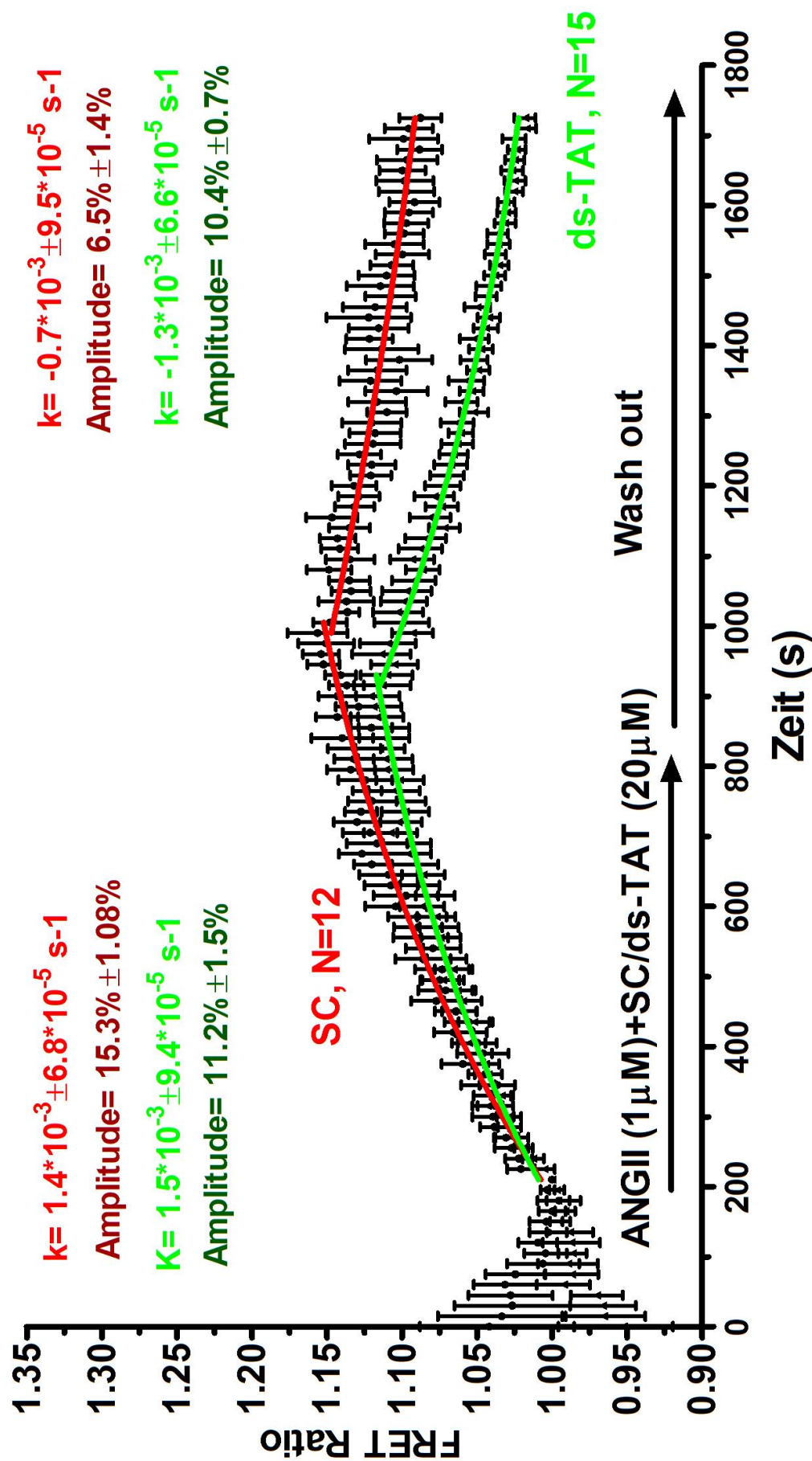


Abbildung 44 Zytosolische Reaktionsverläufe von autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) unter ANGII (1 μ M) in Kombination mit Scramble (SC N=12) oder unter ANGII in Kombination mit gp91-ds-tat (ds-TAT N=15). Das FRET-Signal wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die Daten wurden bei 210s auf 1 normiert. Versuchsalgorithmus 3.5.1.

3.5.5 Nukleäre Reaktionsverläufe der Wildtyp-Zellen (WT) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT)

Die nukleären Reaktionsverläufe unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und Scramble (SC) bzw. unter Angiotensin II (ANGII) und gp91-ds-tat (ds-TAT) (vgl. Abb. 45) entsprechen in etwa denen im Zytoplasma (vgl. Abb. 43) bzw. dem der Originalregistrierung (vgl. Abb. 42): Die Anregung mit ANGII führt zu einer exponentiellen Aktivitätsentwicklung ($f(x) = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - \exp^{-k \cdot x})$), die sich auch nach Beendigung der Stimulation fortsetzt. Die Bildung eines stabilen Aktivitätsniveaus und die Aktivitätsrückbildung sind, vermutlich aufgrund des gegenüber der Originalregistrierung kürzeren Beobachtungsintervalls, nicht zu sehen.

Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit der Wildtyp-Zellen (WT) ist unter Angiotensin II (ANGII) und dem Kontroll-Protein Scramble (SC) ($k = 1.0 \cdot 10^{-3} \pm 1.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 45) doppelt so schnell wie unter Angiotensin II (ANGII) und dem NOX2-Inhibitor gp91-ds-TAT (da-TAT) ($k = 0.53 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 45).

Außerdem ist die CaMKII-Aktivität (Amplitude) unter ANGII und Scramble (SC) (Amplitude bei 810s $12.7\% \pm 0.7\%$, Amplitude bei 1725s $18.9\% \pm 0.45\%$, vgl. Abb. 45) um ca. ein Drittel größer als unter Angiotensin II und ds-TAT (Amplitude bei 810s $6.7\% \pm 0.72\%$; Amplitude bei 1725s $12.6\% \pm 0.76\%$, vgl. Abb. 45).

Vergleicht man die subzellulären Kompartimente (Zytosol und Nukleus) der Wildtyp-Zellen (WT) miteinander, fällt auf, dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) im Zytoplasma schneller ist als im Nukleus und zwar sowohl unter Stimulation mit ANGII und Scramble (SC) (k im Zytosol $1.3 \cdot 10^{-3} \pm 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 43); k im Nukleus $1.0 \cdot 10^{-3} \pm 1.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 45)) als auch unter Anregung mit ANGII und gp91-ds-TAT (k im Zytosol $0.7 \cdot 10^{-3} \pm 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 43); k im Nukleus $0.53 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 45)).

Hinsichtlich der Amplituden zeigen sich zwischen Zytoplasma (vgl. Abb. 43) und Zellkern (vgl. Abb. 45) allenfalls marginale Abweichungen, sowohl unter ANGII und Scramble (SC) als auch unter ANGII und gp91-ds-TAT (ds-TAT).

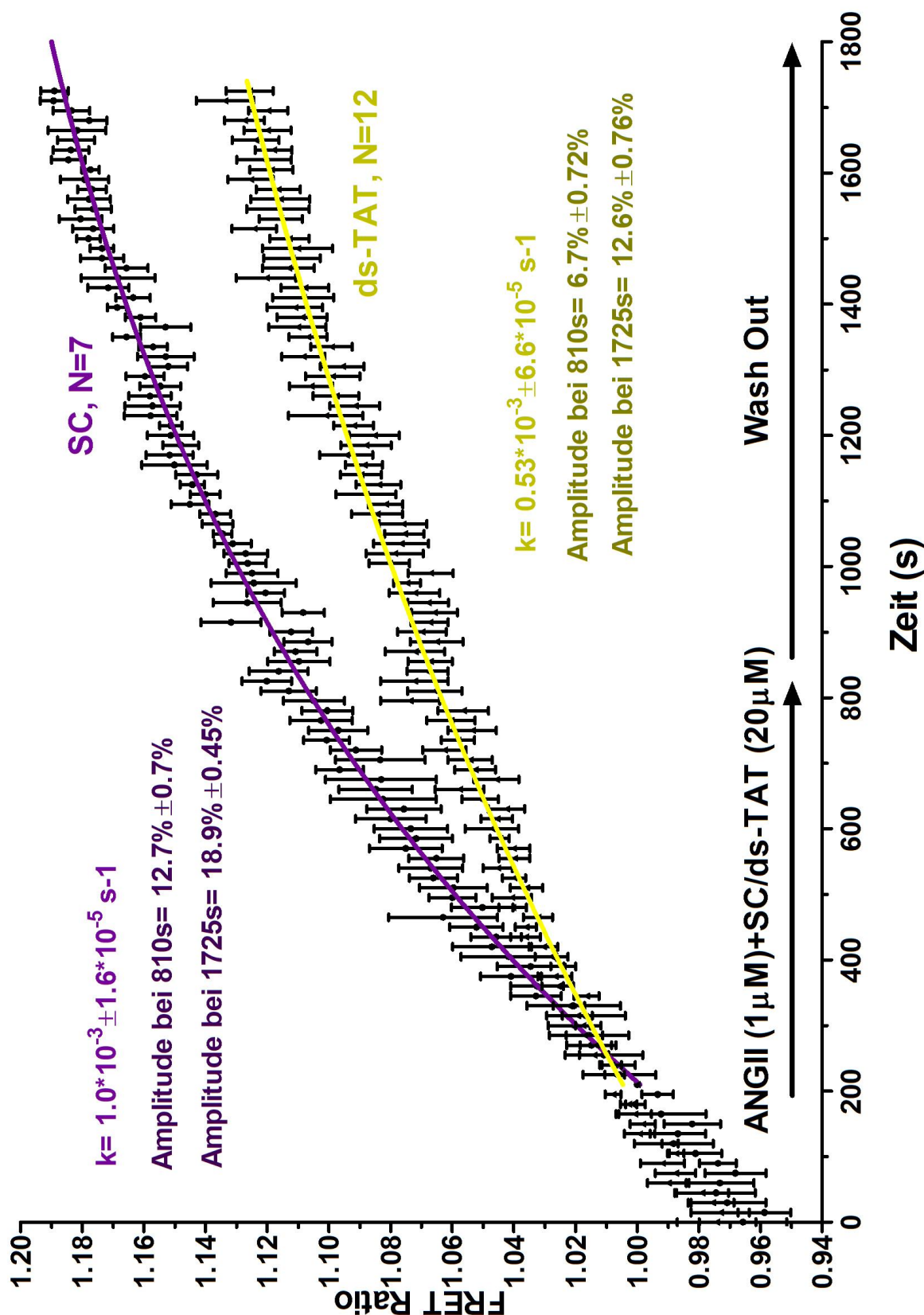


Abbildung 45 Nukleäre Reaktionsverläufe von Wildtyp-Zellen (WT) unter ANGII (1 μ M) in Kombination mit Scramble (SC N=7) und unter ANGII (1 μ M) in Kombination mit gp91-ds-tat (ds-TAT N=12). Das FRET-Signal wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die Daten wurden bei 210s auf 1 normiert. Der Versuchsalgorithmus entspricht 3.5.1.

3.5.6 Nukleäre Reaktionsverläufe der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter ANGII + Scramble (SC) und unter ANGII + gp91-ds-tat (ds-TAT)

Die nukleären Reaktionsverläufe der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) (vgl. Abb. 46) entsprechen annähernd denen im zytoplasmatischen Kompartiment (vgl. Abb. 44), weichen aber von denen der Wildtyp-Zellen (WT) (vgl. Abb. 43 und 45) und vom Reaktionsverlauf der Originalregistrierung (vgl. Abb. 42) ab:

Unter Stimulation mit ANGII und Scramble (SC) beziehungsweise ANGII und dem NOX2-Inhibitor gp91-ds-tat (ds-TAT) kommt es zu einem exponentiellen Aktivitätsanstieg, der mit der Funktionsgleichung $f(x)=Y_0+(Plateau-Y_0)*(1-\exp^{-k*x})$ beschrieben werden kann. Eine Plateaubildung wie in der Originalregistrierung bleibt aus, dafür zeigt sich analog zum zytoplasmatischen Reaktionsverlauf der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) (vgl. Abb. 44) eine sich an das Stimulationsende anschließende Aktivitätsrückbildung mit der exponentiellen Regressionsgleichung $f(x)=(Y_0 - Plateau)*\exp^{-k*x} + Plateau$. Während die Aktivitätsrückbildung im Zytoplasma unter ANGII plus Scramble (SC) (1005s) und unter ANGII plus gp91-ds-TAT (ds-TAT) (915s) allerdings nahezu zeitgleich einsetzt, ist der Beginn der Aktivitätsrückbildung im Nukleus unter ANGII und Scramble (1095s) (vgl. Abb. 44) gegenüber ANGII und gp91-ds-TAT (840s) etwas verzögert (vgl. Abb. 46).

Im Stimulationsintervall (210 - 810s) ist die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter Angiotensin II (ANGII) und Scramble (SC) ($k=1.3*10^{-3}\pm 3.2*10^{-5} s^{-1}$, vgl. Abb. 46) um ca. ein Drittel langsamer als unter Stimulation mit ANGII und dem NOX-2-Inhibitor gp91-ds-TAT (ds-TAT) ($k=1.9*10^{-3}\pm 8.9*10^{-5} s^{-1}$, vgl. Abb. 46). Diese Differenz ist im Wash Out Intervall sogar noch größer: Die k-Konstante während der Aktivitätsrückbildung ist unter Angiotensin II (ANGII) und Scramble (SC) ($k=-0.6*10^{-3}\pm 5.2*10^{-5} s^{-1}$, vgl. Abb. 46) um ca. zwei Drittel langsamer als unter Angiotensin II (ANGII) und gp91-ds-TAT (ds-TAT) ($k=-1.6*10^{-3}\pm 7.9*10^{-5} s^{-1}$, vgl. Abb. 46). Anders ausgedrückt ist die Aktivitätsrückbildung in Anwesenheit des NOX2-Inhibitors gp91-ds-TAT in den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) fast drei Mal so schnell wie unter Stimulation mit Angiotensin II und Scramble. Das CaMKII-Aktivitätsausmaß (Amplitude) unter Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und Scramble (Amplitude $21.02\%\pm 1.28\%$, vgl. Abb. 46) ist im nukleären Kompartiment der nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) um ca. zwei Drittel größer als unter Anwesenheit des NOX-2-Inhibitors gp91-ds-TAT (ds-TAT) (Amplitude $13.36\%\pm 1.38\%$, vgl. Abb. 46).

3. Ergebnisse

Vergleicht man die nukleären Kompartimente von Wildtyp (WT) und nicht autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten (T2A) miteinander, zeigt sich in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) eine schnellere CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) und zwar sowohl unter Stimulation mit Angiotensin II und Scramble (SC) als auch unter Angiotensin II und gp91-ds-TAT (ds-TAT) (vgl. Abb. 45 und 46).

Vergleicht man die nukleäre und zytoplasmatische Reaktionskinetik der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) miteinander, zeigen sich unter Stimulation mit Angiotensin II und Scramble (SC) annähernd gleiche CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten (vgl. Abb. 44 und 46). In Anwesenheit des NOX-2-Inhibitors (ds-TAT) ist die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) im Nukleus ($k=1.9 \cdot 10^{-3} \pm 8.9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k=-1.6 \cdot 10^{-3} \pm 7.9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 46) schneller als im Zytoplasma ($k=1.5 \cdot 10^{-3} \pm 9.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k=-1.3 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, vgl. Abb. 44). Die CaMKII-Aktivität ist im nukleären Kompartiment jeweils größer als im zytoplasmatischen, zum Teil aber nur geringgradig (vgl. Abb. 44 und 46). Dies gilt sowohl für die Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und Scramble als auch für die Anregung mit Angiotensin II (ANGII) und gp91-ds-TAT (ds-TAT).

Die Gegenüberstellung der nukleären Amplituden von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) erfolgte in zwei Schritten:

Bei 810s ist die Amplitude der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) unter ANGII und Scramble (Amplitude $21.02\% \pm 1.28\%$, vgl. Abb. 46) fast doppelt so groß wie die der Wildtyp-Zellen (WT) (Amplitude $12.7\% \pm 0.7\%$, vgl. Abb. 45). Da die Wildtyp-Zellen (WT) und die Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) ihr Aktivitätsmaximum allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichen, erreichen beide über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg annähernd das gleiche CaMKII-Aktivitätsausmaß (T2A bei ca. 810s (Amplitude $21.02\% \pm 1.28\%$, vgl. Abb. 46) und WT bei ca. 1725s (Amplitude $18.9\% \pm 0.45\%$, vgl. Abb. 45)). Das gleiche gilt für die Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) und gp91-ds-TAT (vgl. Abb. 45 und 46).

Zusammenfassend betrachtet führt die kombinierte Hemmung der CaMKII-Oxidation und der CaMKII-Autophosphorylierung auch im Nukleus zu einer verminderten CaMKII-Aktivität gegenüber der Stimulation mit ANGII+SC und zu einer fast vollständigen Rückbildung der CaMKII-Aktivität nach Beendigung der Stimulation.

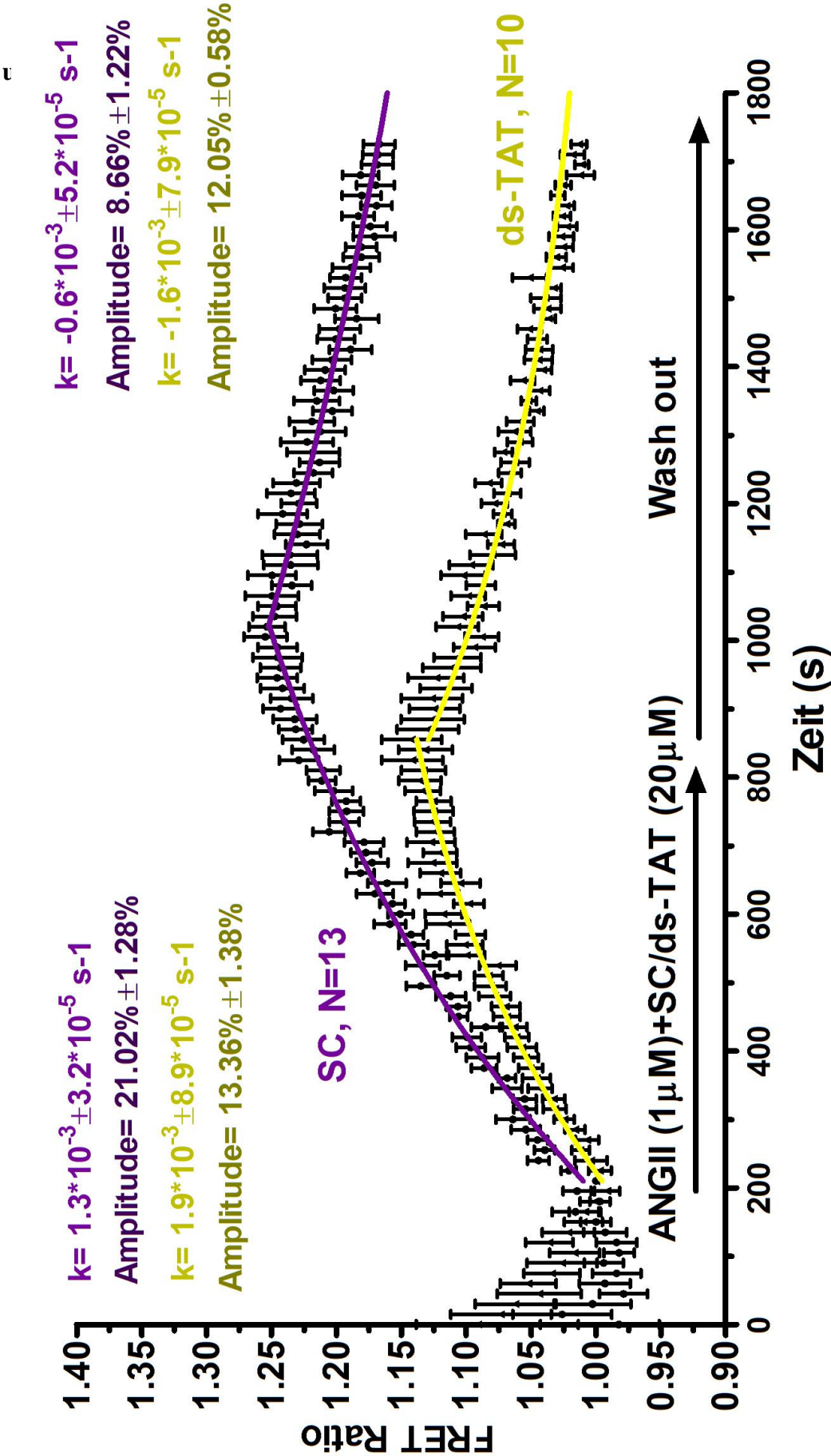


Abbildung 46 Nukleäre Reaktionsverläufe von Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter ANGII (1 μ M) in Kombination mit Scramble (SC N=13) und unter ANGII (1 μ M) in Kombination mit gp91-ds-tat (ds-TAT N=10). Das FRET-Signal wurde als Maß der Enzymaktivität gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die Daten wurden bei 210s auf 1 normiert. Der Versuchsalgorithmus entspricht 3.5.1.

3.5.7 Statistische Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten k

In Abb. 47 sind die Geschwindigkeitskonstanten k der Wildtyp-Zellen (WT) und der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma und im Nukleus gegenübergestellt. Die Zellen wurden mit Angiotensin II (ANGII) und Scramble (SC) bzw. mit Angiotensin II (ANGII) und gp91-ds-tat (ds-TAT) entsprechend des in 3.5.1 beschriebenen Versuchsalgorithmus stimuliert.

Die Geschwindigkeitskonstanten wurden einer bidirektionalen Varianzanalyse (TWO-WAY-ANOVA) mit Post-Hoc-Test Holm-Sidak ($p < 0.05$) unterzogen um die Signifikanz der Geschwindigkeitsunterscheide zu prüfen. Beide Kompartimente (Zytoplasma und Nukleus) wurden berücksichtigt.

Zunächst wurden die k -Unterschiede zwischen den Wildtyp-Zellen (WT) und den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) näher betrachtet: In Anwesenheit des Kontrollproteins Scramble (SC) bestehen zwischen den Wildtyp-Zellen (WT) und den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) keine Signifikanz-Unterschiede, weder im Zytoplasma noch im Nukleus. Unter Stimulation mit gp91-ds-tat (ds-TAT) ist die CaMKII-Aktivierung in beiden Zellkompartimenten in den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) schneller (* und $p < 0.05$ in Abb. 47).

Im direkten Vergleich Scramble versus gp91-ds-tat zeigt sich bezüglich der Wildtyp-Zellen (WT) eine schnellere CaMKII-Aktivierung unter Scramble und zwar in beiden Zellkompartimenten (* und # in Abb. 47). Anders verhält es sich innerhalb der autophosphorylierungsunfähigen Zellen (T2A): Die Aktivierungsgeschwindigkeiten unter gp91-ds-tat (ds-TAT) sind schneller gegenüber Scramble (SC) († und § in Abb. 47).

Vergleicht man die beiden Zellkompartimente miteinander, zeigen sich unter Stimulation mit ANGII+Scramble keine signifikanten Unterschiede, weder innerhalb der Wildtyp-Zellen (WT) noch innerhalb der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A).

Anders verhält es sich hingegen unter Stimulation mit ANGII+gp91-ds-tat: Innerhalb der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) ist die nukleäre Aktivierungsgeschwindigkeit unter ANGII+gp91-ds-tat schneller gegenüber der im Zytoplasma (• in Abb. 47). Innerhalb der Wildtyp-Zellen (WT) besteht zwar kein Signifikanz-Unterschied, aber es fällt auf, dass sich Zytoplasma und Nukleus bezüglich der Aktivierungsgeschwindigkeit entgegengesetzt zu den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) verhalten: Vom Zytoplasma zum Nukleus nimmt die Geschwindigkeit (k in s^{-1}) in den Wildtyp-Zellen (WT) ab und in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) zu.

3. Ergebnisse

Insgesamt zeigt die Wildtyp-Geschwindigkeitskonstante im Stimulationsintervall (vgl. Abb. 47) von links nach rechts eine abnehmende Tendenz. In den Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) ist von links nach rechts eher eine Zunahme der Aktivierungsgeschwindigkeit zu beobachten. Dies lässt den Schluss zu, dass die Autophosphorylierung an der ANGII-assoziierten CaMKII-Aktivierung beteiligt ist.

Im Wash Out Intervall finden sich in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) negative Geschwindigkeitskonstanten, weil es sich um eine Aktivitätsrückbildung handelt. Naturgemäß sind diese negativen Geschwindigkeitskonstanten signifikant kleiner als die positiven Geschwindigkeitskonstanten der Wildtyp-Zellen (WT) im Wash Out Intervall und auch signifikant kleiner als die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) unter Stimulation mit ANGII (†, §, • und % in Abb. 47, Wash Out). Im Wash Out existieren keine Signifikanz-Unterschiede zwischen den k-Konstanten innerhalb der Wildtyp-Zellen (WT), weder für die beiden Zellkompartimente noch für die beiden Stimulationsarten (Scramble (SC) und gp91-ds-tat (ds-TAT)).

Allerdings findet sich auch im Wash Out ein Signifikanz-Unterschied zwischen der zytoplasmatischen und der nukleären Geschwindigkeitskonstante der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) ($p < 0.05$ in Abb. 47, Wash Out). Unter Stimulation mit ANGII+Scramble existiert dieser Unterschied zwischen den Kompartimenten der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) nicht. Präzisiert ausgedrückt sind die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten von Zytoplasma und Nukleus in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) sowohl unter Stimulation als auch im Wash Out annähernd gleich groß (vgl. Abb. 47).

Zusammenfassend lässt sich nach intensiver Untersuchung der Geschwindigkeitskonstanten festhalten, dass die Autophosphorylierung an der ANGII-vermittelten CaMKII-beteiligt zu sein scheint.

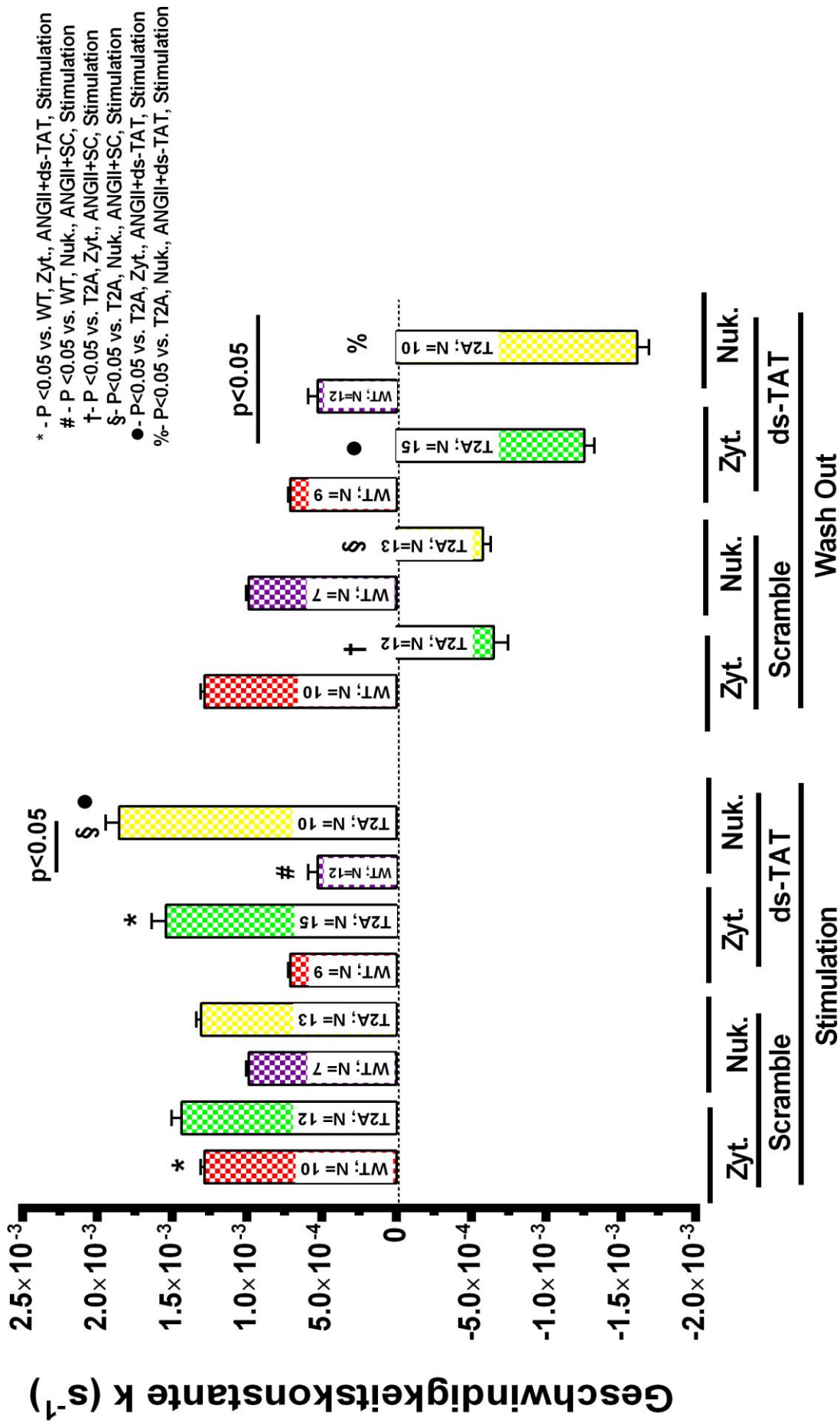


Abbildung 47 Two-Way-ANOVA der Geschwindigkeitskonstante k von Wildtyp-Zellen (WT) und von Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma/Nukleus unter Stimulation mit ANGII in Kombination mit Scramble/gp-91-ds-TAT (SC/ds-TAT) (Versuchsalgorithmus 3.5.1).

3.5.8 Statistische Gegenüberstellung der Amplituden

Auch die Amplituden der nach dem Versuchsalgorithmus aus 3.5.1 stimulierten Kardiomyozyten (Wildtyp und autophosphorylierungsunfähig) wurden einer bidirektionalen Varianzanalyse (TWO-WAY-ANOVA) mit Post-Hoc-Test Holm-Sidak ($p < 0.05$) unterzogen. Berücksichtigt wurden dabei beide Zellkompartimente (Zytoplasma und Nukleus). Die Ergebnisse sind in der Abb. 48 dargestellt.

Betrachtet man die Abb. 48 oberflächlich lassen sich bestimmte Tendenzen erkennen:

Im Stimulationsintervall ist die CaMKII-Aktivität in den Zellen mit der CaMKII-Mutante (T2A) stets größer als die in den Wildtyp-Kardiomyozyten (WT). Ebenso sind die Amplituden unter ANGII+gp91-ds-tat kleiner gegenüber denen unter Stimulation mit ANGII+ Scramble. In den autophosphorylierungsunfähigen Zellen (T2A) ist die CaMKII-Aktivität im Nukleus größer, in den Wildtyp-Kardiomyozyten (WT) hingegen im Zytoplasma.

Betrachtet man das Wash Out Intervall zeigt die Enzymaktivität in den Wildtyp-Zellen (WT) von links nach rechts eine abnehmende und in den Kompartimenten der autophosphorylierungsunfähigen Zellen (T2A) von links nach rechts eine zunehmende Tendenz.

Ein interessanter Aspekt ist, dass die Enzymaktivitäten der autophosphorylierungsunfähigen Zellen (T2A) im Wash Out Intervall stets kleiner sind als die Aktivitäten der WT-Zellen (WT) (Gegensatz zum Stimulationsintervall), obwohl die Aktivitäten der autophosphorylierungsunfähigen Zellen (T2A) eher ansteigen und die in den Wildtyp-Kardiomyozyten (WT) eher abfallen.

Zusammenfassend betrachtet und in Kombination mit den Reaktionsverläufen (vgl. Abb. 43 bis 46) lässt sich Folgendes festhalten: Die Enzymaktivität der Wildtyp-Zellen (WT) steigt auch nach Beendigung der Stimulation weiter an, aber das Ausmaß des Anstiegs ist unter Stimulation mit ANGII+gp91-ds-tat kleiner als unter Stimulation mit ANGII+ Scramble. Zudem ist der Aktivitätsanstieg im Zytoplasma stärker ausgeprägt als im Nukleus.

In den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) zeigt sich zwar unter Stimulation eine größere CaMKII-Aktivität gegenüber den Wildtyp-Zellen (WT), die aber nach Beendigung der Anregung nicht aufrecht erhalten werden kann. Die Amplituden der autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) im Wash Out Intervall sind vielmehr Ausdruck der Aktivitätsrückbildung (vgl. Abb. 43-46), die unter ANGII+gp91-ds-tst und im Nukleus stärker ausfällt als unter ANGII+Scramble und im Zytoplasma.

Die wichtigsten Signifikanz-Unterschiede sind in Abb. 48 aufgeführt.

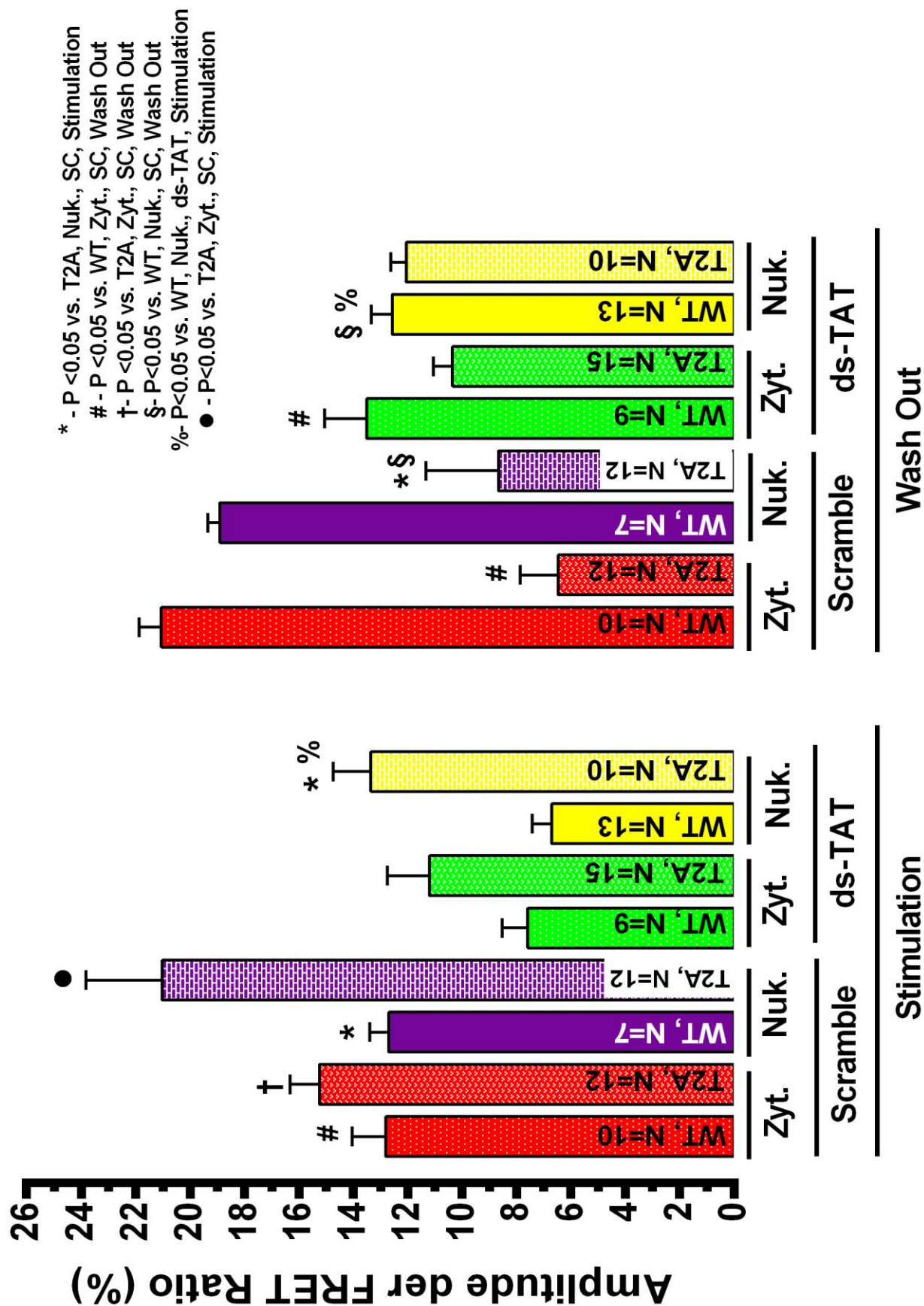


Abbildung 48 Two-Way-ANOVA der Amplituden von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma und im Nukleus unter ANGII (Versuchsalgorithmus 3.5.1).

3.6 Gegenüberstellung der kinetischen Parameter (k und Amplitude) unter den Versuchsbedingungen von 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1

3.6.1 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten (k in s⁻¹)

Um die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Versuchsalgorithmen besser und direkter miteinander vergleichen zu können, findet sich in Tabelle 10 eine Gegenüberstellung. Die Amplituden sind in Abschnitt 3.6.2 in Tabelle 11 aufgeführt.

Stimulation	WT (MEAN±SEM) [in s ⁻¹]		T2A (MEAN±SEM) [in s ⁻¹]	
	Zytosol	Nukleus	Zytosol	Nukleus
Elektrische Feldstimulation	$2.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.7 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-3} \pm 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4}$
Stimulations-pause	$-2.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.9 \cdot 10^{-4}$	$-1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4}$	$-1.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.9 \cdot 10^{-4}$	$-1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3}$
Stimulation mit Isoproterenol	$1.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$	$0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$	$0.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-4}$	$0.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$
Elektrische Feldstimulation + Isoproterenol	$2.4 \cdot 10^{-3} \pm 8.5 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-3} \pm 4.0 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-3} \pm 5.7 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-3} \pm 4.2 \cdot 10^{-5}$
ANGII+SC Stimulation	$1.3 \cdot 10^{-3} \pm 2.5 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-3} \pm 1.6 \cdot 10^{-5}$	$1.4 \cdot 10^{-3} \pm 6.8 \cdot 10^{-5}$	$1.3 \cdot 10^{-3} \pm 3.2 \cdot 10^{-5}$
ANGII+SC Wash Out	$1.3 \cdot 10^{-3} \pm 2.5 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-3} \pm 1.6 \cdot 10^{-5}$	$-0.7 \cdot 10^{-3} \pm 9.5 \cdot 10^{-5}$	$-0.6 \cdot 10^{-3} \pm 5.2 \cdot 10^{-5}$
ANGII+ds-TAT Stimulation	$0.7 \cdot 10^{-3} \pm 1.4 \cdot 10^{-5}$	$0.5 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-3} \pm 9.4 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-3} \pm 8.9 \cdot 10^{-5}$

3. Ergebnisse

ANGII+ds-TAT Wash Out	$0.7 \cdot 10^{-3} \pm 1.4 \cdot 10^{-5}$	$0.5 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5}$	$-1.3 \cdot 10^{-3} \pm 6.6 \cdot 10^{-5}$	$-1.6 \cdot 10^{-3} \pm 7.9 \cdot 10^{-5}$
--------------------------	---	---	--	--

Tabelle 10 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivitätsgeschwindigkeiten (k) unter den Versuchsbedingungen von 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1.

3.6.2 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivitäten (Amplituden in %)

Stimulation	WT (MEAN±SEM) [in %]		T2A (MEAN±SEM) [in %]	
	Zytosol	Nukleus	Zytosol	Nukleus
Elektrische Feldstimulation	6.96±0.46	5.44±0.47	6.44±1.1	4.66±0.61
Stimulationspause	5.31±0.47	4.7±0.14	5.76±0.17	4.4±0.31
Stimulation mit Isoproterenol	13.5±0.59	10.8±0.09	4.3±0.92	7.1±0.22
Elektrische Feldstimulation + Isoproterenol	33.41±1.11	19.89±0.97	13.78±0.64	10.08±0.56
ANGII+SC Stimulation	12.8±1.2	12.7±0.7	15.3±1.08	21.02±1.28
ANGII+SC Wash Out	21.1±0.8	18.9±0.45	6.5±1.4	8.66±1.22
ANGII+ds-TAT Stimulation	7.6±0.9	6.7±0.72	11.2±1.5	13.36±1.38
ANGII+ds-TAT Wash Out	13.5±1.5	12.6±0.76	10.4±0.7	12.05±0.58

Tabelle 11 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivitäten (Amplituden) unter den Versuchsbedingungen von 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1

4. Diskussion

Die CaMKII ist ein multifunktionelles Enzym mit einem komplexen Aufbau und einer Vielzahl an Aufgaben. Entsprechend vielfältig und zum Teil komplex sind die Ergebnisse, die bei der Untersuchung ihrer Reaktionskinetik und -dynamik erzielt werden konnten. Im Fokus steht unter anderem die Bedeutung der Autophosphorylierung für die CaMKII-Reaktionsmechanismen.

In Abschnitt 4.1 werden kurz die Optimierung der Versuchsbedingungen und die Problemlösung potentieller Störfaktoren angesprochen. Die Abschnitte 4.2 und 4.3 konzentrieren sich auf die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) und die CaMKII-Aktivität (Amplitude). Abschnitt 4.4 beschäftigt sich mit dem CaMKII-Reaktionsverhalten unter Stimulation mit ANGII und dem oxidationsabhängigen Aktivierungsweg. Zu beachten ist, dass in 4.1 bis 4.4 nur die zytoplasmatischen Zellkompartimente berücksichtigt wurden, während Abschnitt 4.5 auf das nukleäre CaMKII-Reaktionsverhalten eingeht. Abschnitt 4.6 gewährt einen Ausblick für zukünftige Forschungsprojekte und erwähnt die Limitationen der vorliegenden Arbeit.

4.1 Optimierung der Versuchsbedingungen und Lösungsansätze bezüglich potentieller Störfaktoren

Aussagekräftige Versuchsergebnisse sind nur mit hochqualitativem Zellmaterial zu erreichen. Bedingt durch den Versuchsaufbau wurden die zu untersuchenden Kardiomyozyten allerdings schon vor Beginn der eigentlichen Messungen zwingend mehreren Stressfaktoren ausgesetzt, zum Beispiel der adenoviralen Transduktion und der Zellkultur. Die Versuche aus Abschnitt 3.2 dienten der Identifizierung weiterer Stressoren und deren bestmöglicher Vermeidung bzw. Reduzierung:

Mit 100 pfu/cell wurde die Multiplicity of infection (MOI) ermittelt, die eine maximale Fluoreszenz bei möglichst geringer Virustoxizität gewährleistet. Diese MOI fand bereits Anwendung in vorherigen Versuchsreihen (Erickson et al. 2011b).

Als Versuchstier-Modell wurden nicht Mäuse, sondern Ratten genutzt, da sie sich gegenüber der gewählten MOI, der 48 stündigen Zellkultur und den mehr als 30 minütigen Messprotokollen als robuster und weniger anfällig für präfinale Artefakte erwiesen. In den Experimenten zur Etablierung des Ad-Camui α -Sensors wurden nicht Maus- sondern Kaninchen-Kardiomyozyten verwendet (Erickson et al. 2011b).

4. Diskussion

Um eine Beeinflussung der physiologischen Zelleigenschaften zu vermeiden wurde anstelle eines Lentivirus ein adenoviraler Vektor genutzt. Außerdem wurde auf die Verwendung von BDM während der Messungen verzichtet (Verrecchia und Hervé 1997; Watanabe et al. 2001; Zhao et al. 2002). Wichtig war außerdem, dass die Virus-Infektiösität durch die Verwendung von CsCl (vgl. 2.3.4) nicht negativ beeinflusst wurde (Kreppel et al. 2005).

Die Wahl der Epifluoreszenzmikroskopie beruht vor allem darauf, dass keine andere Technik in der Lage ist, die Protein-Protein-Interaktionen mit einer so guten zeitlichen und räumlichen Auflösung darzustellen (Lottspeich und Engels 2012). Ein weiteres Argument war die Tatsache, dass die CFP- und YFP-Fluoreszenzen nicht durch oxidativen Stress beeinflusst werden (Erickson et al. 2011b) und eine Verfälschung der Ergebnisse unter Anregung mit ANGII ausgeschlossen werden konnte. Jegliche Veränderung der Messwerte konnten einwandfrei auf eine Aktivitätsänderung der CaMKII zurückgeführt werden.

Nachteilig bei dem Verfahren war die hohe Anfälligkeit gegenüber Bleed-Throgh, Cross-talk und Photobleaching. Diese Störfaktoren konnten durch mathematische Korrekturverfahren minimiert werden (vgl. Abschnitt 2.6.1). Zur Prävention der epifluoreszenzgekoppelten Störfaktoren wurden auch die Lösungsansätze aus dem Methodenpaper BÖRNER ET AL. 2011 herangezogen.

Zur Visualisierung und Quantifizierung der CaMKII-Konformationsänderung als Maß für die Enzymaktivität wurde der Fluoreszenz-basierte Sensor Ad-Camui α (vgl. 2.3.2) genutzt. Zu beachten ist, dass dieser Sensor ursprünglich für neurologische Forschungsprojekte konzipiert wurde und deshalb an die α -Untereinheit der CaMKII angepasst ist, die im Gegensatz zur δ -Untereinheit nicht als Dodecamer sondern als Dimer vorliegt (Takao et al. 2005; Kwok et al. 2008). Allerdings konnte die erfolgreiche Anwendung auch bei der Verwendung von Kardiomyozyten gezeigt werden (Erickson et al. 2011b).

Durch die eigens entwickelte Messelektrode (vgl. Abb. 24) konnten Versuchsbedingungen und Messergebnisse weiter optimiert werden.

Die Verwendung von Regressionsgleichungen ermöglichte die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den drei Versuchsalgorithmen 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1, trotz zum Teil sehr unterschiedlicher Reaktionskinetiken.

Die oben dargelegten Erkenntnisse schaffen die Rahmenbedingungen für zukünftige Forschungsprojekte, die mit Zellkultur und Epifluoreszenzmikroskopie arbeiten. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich der genutzte Versuchsaufbau gut zur Visualisierung der CaMKII-Reaktionskinetik und dem Vergleich der einzelnen CaMKII-Reaktionsmechanismen eignet.

4. Diskussion

Die drei Stimulationsarten (elektrische Feldstimulation, Stimulation der β -Rezeptoren mit Isoproterenol und Stimulation mit ANGII) eignen sich zur Nachbildung der drei bekannten CaMKII δ -Aktivierungsmechanismen (Ca^{2+} /CaM, Autophosphorylierung und Oxidation; vgl. 1.5.4).

4.2 Die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit ist vornehmlich von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und nicht von der Autophosphorylierung abhängig

Die CaMKII fungiert unter anderem als intrazellulärer Mediator kalziumabhängiger Signale. Die Anbindung eines $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplexes hebt die unter basalen Bedingungen bestehende Autoinhibition auf, wodurch die um das 100-1000fach gesenkte Grundaktivität (Kemp et al. 1994; Hudmon und Schulman 2002b) ihr volles Potential entfalten kann. Dieser initiale Aktivierungsschritt ist nicht nur für die CaMKII-Grundaktivität wichtig, sondern auch für übergeordnete Aktivierungsmechanismen: So ist die CaMKII-Autophosphorylierung nur möglich, wenn es vorher zu einer Konformationsänderung durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindung gekommen ist (Erickson 2014). Die vollständige Pufferung der intrazellulären Kalziumionen führt außerdem dazu, dass die CaMKII-Oxidation nicht mehr stattfinden kann (Wagner et al. 2011).

Umgekehrt konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals bestätigt werden, dass die Autophosphorylierung für die CaMKII-Grundaktivität nicht von Bedeutung ist, wie bereits 2002 von HUDMON UND SCHULMAN vermutet wurde:

Die $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -abhängige CaMKII-Grundaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Anregung durch elektrische Feldstimulation (2 Hz, 20 mV) nachgebildet (vgl. Versuchsalgorithmus 3.3.1): Die elektrische Feldstimulation führte zu einem sofortigen Anstieg der FRET ratio als Maß für die CaMKII-Aktivität. Nach Stimulationsende kam es zu einer unmittelbaren und vollständigen Rückbildung selbiger Aktivität (vgl. Abb. 32). Die Hemmung der Autophosphorylierung verändert weder die Geschwindigkeitskonstante (k) noch das Ausmaß der FRET ratio (Amplitude) (vgl. Abb. 35 und 36). Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die CaMKII-Aktivität unter elektrischer Feldstimulation autophosphorylierungsunabhängig ist. Geht man davon aus, dass die CaMKII-Aktivität unter elektrischer Feldstimulation der $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -abhängigen CaMKII-Grundaktivierung auch wirklich entspricht, dann würde dies auch die Autophosphorylierungsunabhängigkeit der Grundaktivierung beweisen.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ nicht nur zur Initiierung der CaMKII-Aktivität dient, sondern auch die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter β -adrenerger Stimulation beeinflusst:

Die Kardiomyozyten die in 3.3 β -adrenerg mit Isoproterenol stimuliert wurden, zeigten einen prolongierten Anstieg der FRET ratio gegenüber der elektrischen Feldstimulation. Interessanterweise war der Anstieg der FRET ratio (k-Konstante) allerdings nur halb so schnell wie der unter elektrischer Feldstimulation. Die simultane Anregung mit elektrischer Feldstimulation

4. Diskussion

und β -adrenerger Stimulation (Isoproterenol) führte zwar zu einer signifikant schnelleren Aktivierung gegenüber der alleinigen Stimulation der β -Rezeptoren mit Isoproterenol, allerdings war die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) unter kombinierter Stimulation mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol nicht schneller als die unter alleiniger elektrischer Feldstimulation.

Ein zusätzlich interessanter Aspekt ist, dass die CaMKII-Aktivität unter β -adrenerger Stimulation im Gegensatz zur elektrischen Feldstimulation in hohem Maße autophosphorylierungsabhängig ist: Die Hemmung der Autophosphorylierung führte zu einem Absinken der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) auf ein Drittel der Geschwindigkeit unter elektrischer Feldstimulation (vgl. Abb. 33 und 35). Die Steigerung der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) unter kombinierter Anregung mit elektrischer Feldstimulation und Isoproterenol ist hingegen autophosphorylierungsunabhängig (vgl. Abb. 40).

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) Ca^{2+} /CaM-abhängig ist und die Autophosphorylierung allenfalls einen geringen Einfluss ausübt.

Da die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) unter β -adrenerger Stimulation und bei gleichzeitiger Hemmung der Autophosphorylierung langsamer ist als unter elektrischer Feldstimulation, lässt sich außerdem schlussfolgern, dass die β -adrenerge Stimulation nur zu einer geringen Mobilisation von Kalziumionen in das Zytoplasma führt. Dies wird durch Erkenntnisse aus anderen Quellen unterstützt (Bers 2001).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Ca^{2+} /CaM-abhängige CaMKII-Aktivierung autophosphorylierungsunabhängig, aber von kurzer Dauer ist. Eine prolongierte CaMKII-Aktivierung geht mit der Autophosphorylierung des Enzyms einher. Allerdings ist die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) sowohl unter elektrischer Feldstimulation als auch unter Stimulation der β -Rezeptoren kalziumabhängig.

Für die pathologischen Auswirkungen der CaMKII ist allerdings neben der Aktivierungsgeschwindigkeit (k) vor allem das Aktivitätsausmaß (Amplitude) von Bedeutung. Welchen Einfluss die Kalziumionen und die Autophosphorylierung darauf haben wird in Abschnitt 4.3 erläutert.

4.3 Die Autophosphorylierungsabhängigkeit der CaMKII-Aktivität

Das sympathische Nervensystem ist auf die Steigerung körperlicher Leistungen ausgelegt, um das Überleben in Flucht- oder Kampfsituationen zu sichern (Silverthorn 2009). Dazu zählt auch eine β -adrenerg-vermittelte Steigerung der kardialen Auswurfleistung. Da das System auf Kurzzeitgebrauch ausgelegt ist, besteht ein evolutionärer Überlebensvorteil nur unter Vermeidung von Langzeitaktivierung. Chronische oder exzessive Sympathikus-Aktivität fördert die Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten (Communal et al. 1998; Zhu et al. 2001; Zhu et al. 2003). Als Vermittler dieser schädlichen β -adrenergen Effekte wird die CaMKII vermutet. Diese Theorie wird unter anderem dadurch bekräftigt, dass eine Enzymüberexpression im Mausmodell zur Entstehung einer Herzinsuffizienz führt (Zhang et al. 2003; Guo et al. 2006), und dass die Hemmung der CaMKII Arrhythmien bei Herzinsuffizienz reduziert (Wu et al. 2002; Sag et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die CaMKII-Aktivität nur indirekt gemessen, indem man die FRET ratio (Amplitude) und damit die enzymatische Konformationsänderung als Maß für das CaMKII-Aktivitätsausmaß verwendet hat. Dabei sollte stets bedacht werden, dass eine CaMKII-Aktivität möglicherweise auch ohne eine gleichzeitige Konformationsänderung stattfinden kann.

Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol zeigte sich, wie bereits in 4.2 erwähnt, nur eine halb so schnelle CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit als unter elektrischer Feldstimulation. Allerdings kam es auch zu einer fast doppelt so großen FRET-Änderung (vgl. Abb. 40 und 41). Ähnliche Beobachtungen konnten bereits 2011 durch ERICKSON et al. beschrieben werden. Allerdings konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass diese maximale FRET-Änderung bzw. die maximale Konformationsänderung der CaMKII autophosphorylierungsabhängig ist:

Bei Hemmung der Autophosphorylierung (T2A in Abb. 33) sinkt die maximale FRET-Änderung (Amplitude) auf das Niveau unter elektrischer Feldstimulation ab (vgl. Abb. 33 und 36). In Zusammenschau mit 4.2 lässt sich festhalten, dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit kalziumabhängig ist, während die FRET-Änderung bzw. die Konformationsänderung von der Autophosphorylierung abhängig ist.

Allerdings scheint die FRET-Änderung neben der Autophosphorylierung noch von einem weiteren Aktivitätsfaktor abhängig zu sein: Hemmt man nämlich die Autophosphorylierung in Zellen die gleichzeitig β -adrenerg und elektrisch stimuliert werden (vgl. Versuchsalgorithmus 3.4.1), kommt es zwar auch zu einem Abfall der FRET ratio, aber die Amplitude ist im-

4. Diskussion

mer noch größer als die unter elektrischer Feldstimulation und auch als die unter alleiniger β -adrenerger Stimulation (\dagger in Abb. 41). Der Unterschied der Amplituden kann nicht durch die zusätzliche elektrische Feldstimulation erklärt werden, und da die Autophosphorylierung ausgeschaltet ist, muss es einen dritten Aktivitätsfaktor geben, der unter diesen Versuchsbedingungen zu einer Steigerung der FRET ratio führt. Prinzipiell käme die autophosphorylierungsunabhängige Kalzium-Mobilisation unter β -adrenerger Stimulation in Betracht, allerdings handelt es sich dabei wie bereits oben erläutert um eher geringe Mengen (vgl. 4.2 und Bers 2001). Alternativ käme eine durch elektrische oder β -adrenerge Stimulation ausgelöste CaMKII-Oxidation in Betracht. Dafür spricht, dass die CaMKII-Aktivität in autophosphorylierungsunfähigen Zellen unter ANGII annähernd so groß ist, wie die in autophosphorylierungsunfähigen Zellen unter kombinierter elektrischer und β -adrenerger Stimulation (vgl. Abb. 41 und 48).

Die Theorie eines dritten Aktivitätsfaktors würde auch erklären, weshalb sich nicht nur die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit, sondern auch die FRET ratio (Amplitude) durch Kombination der elektrischen und der β -adrenergen Stimulation steigern lässt: Die CaMKII-Aktivität unter kombinierter elektrischer und β -adrenerger Stimulation ist 2,5 Mal so groß wie unter alleiniger β -adrenerger Stimulation und fast 5 Mal so groß wie unter alleiniger elektrischer Feldstimulation.

Gegen die Theorie, dass es sich bei dem dritten Einflussfaktor um eine zusätzliche CaMKII-Oxidation handelt, spricht, dass in Zellen mit einer Methionin 280 deletierten Mutante unter Stimulation mit Isoproterenol eine Erhöhung des Aktivitätsausmaßes beobachtet werden konnte (Erickson et al. 2011b). Ob dieser Anstieg kompensatorisch oder als Folge einer Enthemmung zu verstehen ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Einschränkend muss allerdings ergänzt werden, dass die Daten von ERICKSON et al. aus dem Jahr 2011 mit den hier erarbeiteten nur eingeschränkt vergleichbar sind, weil die Stimulation über einen Zeitraum von 20 Minuten erfolgte und die Reaktionskinetik nicht wie hier fortlaufend, sondern nur punktuell beobachtet wurde. Allerdings lässt sich daraus auch folgern, dass die Dauer des Stimulus für die Interaktion offenbar von Bedeutung ist. Gegebenenfalls hätte man in der vorliegenden Arbeit unter β -adrenerger Stimulation eine vielfach größere Amplitude (FRET ratio) beobachten können, wenn man einen längeren Beobachtungszeitraum gewählt hätte. So kam es bei ERICKSON et al. (2011) zu einem Anstieg der FRET ratio auf über 1,4, sowohl unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol als auch unter kombinierter elektrischer und β -

4. Diskussion

adrenerger Stimulation. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nur eine FRET ratio von maximal 1,14 bzw. 1,35 beobachtet (vgl. Abb. 32 und 37).

Für die Theorie, dass doch eine erhöhte Kalziumkonzentration für die CaMKII-Aktivitätssteigerung verantwortlich ist, spricht, dass ERICKSON et al. (2011) eine Aktivitätssteigerung auch unter kombinierter elektrischer Feldstimulation und Anregung mit Angiotensin II beobachten konnten. Allerdings war das Aktivitätsausmaß darunter immer noch niedriger als unter β -adrenerger Stimulation (mit und ohne gleichzeitige elektrische Feldstimulation). Eine Beschleunigung der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit blieb allerdings aus.

In jedem Fall bedarf dieses Phänomen der weiteren Untersuchung in zukünftigen Forschungsprojekten. Und in jedem Fall beweist dies, dass die CaMKII-Reaktion durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aktivierungswegen zusätzlich beeinflusst werden kann. Die hier erzielten Ergebnisse bieten außerdem die Möglichkeit das Ausmaß der autonomen CaMKII-Aktivität abzuschätzen, das bisher nur für neuronale Isoformen bekannt war und mit weniger 25% der maximalen Enzymaktivität angegeben wurde (Coultrap et al. 2010; Erickson 2014).

Da gezeigt werden konnte, dass die CaMKII-Aktivität unter β -adrenerger Stimulation vor allem auf Autophosphorylierung und damit auf autonome CaMKII-Aktivität zurückzuführen ist, lässt sich das Ausmaß durch die Subtraktion der Amplitude in den autophosphorylierungsunfähigen Zellen von der der Wildtypzellen errechnen. Die Korrektheit dieser Argumentation vorausgesetzt, kann das autonome Aktivitätsausmaß unter β -adrenerger Stimulation auf ca. 10% geschätzt werden. Im Vergleich zu den neuronalen CaMKII-Isoformen wäre die autonome Aktivität demnach erniedrigt. Zu beachten ist allerdings, dass in diesem Versuchsaufbau in Anbetracht des relativ kurzen Stimulations- und Beobachtungsintervalls mutmaßlich nicht die maximale CaMKII-Aktivität erreicht sein dürfte. Um eine exakte Aussage treffen zu können, sind weitere Experimente von Nöten.

4.4 Oxidative Aktivierung der CaMKII

Längst ist bekannt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen nicht nur durch chronische β -adrenerge Aktivität, sondern auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativen Stress ausgelöst werden (Cave et al. 2006; Stevanovic et al. 2009). Die durch reaktive Sauerstoffspezies verursachten Oxidationen führen unter anderem zu kontraktile Dysfunktion und Arrhythmien (Cave et al. 2006; Erickson et al. 2011a). Als ursächlicher Mechanismus ließ sich in Mausexperimenten eine RAAS-Hyperaktivierung (Bendall et al. 2002; Li et al. 2002; Cave et al. 2006) und deren Wirkung auf die NOX2 und die CaMKII identifizieren: In den Versuchstieren kam es unter oxidativem Stress, unabhängig von intrazellulären Kalziumsignalen, zu einer Steigerung der CaMKII-Aktivität mit Hypertrophie und Zellapoptose (Palomeque et al. 2009; Velez Rueda et al. 2012). Diese Entwicklung konnte entweder durch die transgene CaMKII-Inaktivierung oder durch ACE-Hemmer unterbunden werden (Velez Rueda et al. 2012). Daten von mit Isoproterenol behandelten Tieren waren vergleichbar, so dass einer RAAS-Überaktivierung dieselbe kardioschädigende Bedeutung zukommt wie einer chronischen β -adrenergen Aktivität.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte das Verhältnis zwischen diesen beiden Stressoren (oxydativer Stress und chronische β -adrenerge Aktivierung) erstmals detaillierter beleuchtet werden:

Bereits bekannt ist, dass die Stimulation mit Angiotensin II unter physiologischen Bedingungen (Scramble (SC) in Abb. 43) zu einer NOX2-abhängigen, oxidationsvermittelten CaMKII-Aktivierung führt. Auch in den hier vorliegenden Untersuchungen konnte dies nachgewiesen werden (vgl. Scramble (SC) in Abb. 43). Allerdings besitzt die Stimulation mit Angiotensin II (ANGII) offenbar auch einen NOX2-unabhängigen Effekt, denn die ANGII-assoziierte CaMKII-Aktivität bleibt, wenn auch mit geringerer Amplitude, auch unter Hemmung der NOX2 mittels gp91-ds-TAT erhalten (vgl. ds-TAT in Abb. 43).

Hinzu kommt, dass die CaMKII-Aktivität unter Angiotensin II auch nach Beendigung der Stimulation prolongiert, ein klarer Hinweis auf eine autonome CaMKII-Aktivität unter Angiotensin II. Dieser Effekt zeigt sich auch bei Hemmung der NOX2. Da in diesem Fall eine autonome Enzymaktivierung durch Oxidation nicht möglich ist und in Abschnitt 3.3 bzw. Abschnitt 4.3 gezeigt werden konnte, dass die Stimulation mit Ca^{2+} /CaM nicht für eine prolongierte CaMKII-Aktivität ausreicht, kommt als Urheber der fortgeführten Enzymaktivität nur die Autophosphorylierung in Betracht.

4. Diskussion

Dass die prolongierte CaMKII-Aktivität in den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten nicht mehr nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 44), legt den Schluss nahe, dass die autonome CaMKII-Aktivität unter Angiotensin II nicht durch NOX2-abhängige Oxidation, sondern durch Autophosphorylierung hervorgerufen wird. Als alternativer Erklärungsansatz kommt in Frage, dass die oxidations-vermittelte autonome CaMKII-Aktivität nur bei gleichzeitiger Autophosphorylierung stattfinden kann. In jedem Fall scheint ein Teil der ANGII-induzierten CaMKII-Aktivität autophosphorylierungsabhängig zu sein. Die verbleibende Aktivität unter Hemmung der NOX2 und unter gleichzeitiger Hemmung der Autophosphorylierung (vgl. ds-TAT in Abb. 44) entspricht in etwa der CaMKII-Aktivität unter Ca^{2+} /CaM (vgl. Abb. WT in Abbildung 33), so dass davon auszugehen ist, dass auch ANGII zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration führen kann. Dies geschieht möglicherweise über IP3-Rezeptoren.

In den autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten kommt es unter β -adrenerger Stimulation (vgl. Abschnitt 3.3 und 3.4) hingegen nicht zu einer Aktivitätsrückbildung, weil die Stimulation mit Isoproterenol kontinuierlich fortgeführt wurde.

Diese Beobachtungen erhärten die Theorie, dass die drei Aktivierungswege der CaMKII (Ca^{2+} /CaM; β -adrenerge Stimulation; Oxidation) miteinander interagieren und sich wechselseitig beeinflussen. Diese These wird auch von führenden Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der CaMKII-Forschung unterstützt (Erickson et al. 2008; Chao et al. 2010; Erickson et al. 2013; Stratton et al. 2013; Erickson 2014): So konnten CHAO et al. (2010) zeigen, dass benachbarte Untereinheiten der CaMKII sich nach posttranslationaler Modifikation in ihrem Aktivierungs- und Reaktionsverhalten gegenseitig beeinflussen können. Beispielsweise kann nach der Glykosylierung einer CaMKII-Untereinheit ein Phosphorylierungsanstieg an anderen Untereinheiten des Enzyms gemessen werden (Erickson et al. 2013), und folglich findet innerhalb des CaMKII-Moleküls ein Austausch zwischen den verschiedenen Aktivierungsmechanismen statt. Dazu passend schlussfolgern ERICKSON et al. (2014), dass sich aus der großen Vielfalt der durch die CaMKII beeinflussten Signalwege Rückkopplungsmechanismen mit konsekutiven Enzymmodifikationen und Aktivierungsmodulierungen ergeben müssten. Auch aus physiologischer Sicht ergibt eine gegenseitige Einflussnahme Sinn, da im lebenden Organismus Signaltransduktionsprozesse niemals isoliert ablaufen, sondern parallel arbeiten und sich gegenseitig rückkoppeln.

Die CaMKII ist demnach eine Schnittstelle, die die Kalzium-, die Autophosphorylierungs- und die ROS-abhängigen Signaltransduktion miteinander verknüpft.

4. Diskussion

Darüber hinaus zeigen die Versuchsergebnisse, dass die CaMKII-Aktivität nur durch eine gemeinsame Hemmung des autophosphorylierungs- und des oxidationsabhängigen Aktivierungsmechanismus effektiv reduziert werden kann. Die gemeinsame Hemmung der NOX2 und der Autophosphorylierung (vgl. ds-TAT, vgl. Abb. 46) führt zu einem CaMKII-Reaktionsverhalten, das mit dem unter Ca^{2+} -CaM vergleichbar ist (vgl. WT in Abb. 33) und das als nicht schädigend anzusehen ist.

Geht man nun davon aus, dass eine gesteigerte Autophosphorylierung und eine gesteigerte Oxidation der CaMKII gemeinsam zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Herzinsuffizienz beitragen, müssen in einer Therapie auch zwangsläufig beide Stressfaktoren erfasst werden. Dies geschieht bereits durch die gemeinsame Anwendung von Beta-Blockern und RAAS-Hemmern. Die gewonnenen Ergebnisse sind also eine experimentelle Untermauerung für die Richtigkeit der aktuell praktizierten medikamentösen Herzinsuffizienztherapie.

Interessanterweise führt die Hemmung der Autophosphorylierung unter Angiotensin II zu einem Anstieg der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit. Dieser Anstieg wird durch die zusätzliche Hemmung der NOX2 noch weiter verstärkt (vgl. Abb. 47). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Zwischenschritte, die für die Autophosphorylierung (vermutlich cAMP) und die Oxidation (NOX2) notwendig sind, die Aktivierungsgeschwindigkeit gegenüber der alleinigen Aktivierung mit Ca^{2+} /CaM verlangsamen. Sind diese Zwischenschritte ausgeschaltet, kann die CaMKII offensichtlich schneller, wenn auch nicht prolongiert und in geringerem Ausmaß aktiviert werden. Diese Theorie wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass der Reaktionsverlauf unter Angiotensin II und gleichzeitiger Hemmung der Autophosphorylierung und der NOX2 (vgl. ds-TAT in Abb. 44) dem Reaktionsverlauf unter CaMKII-Aktivierung mit Ca^{2+} /CaM ähnelt (vgl. Anregung mit elektrischer Feldstimulation in Abb. 33).

Ein zusätzlicher interessanter Aspekt ist die Entwicklung der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter Angiotensin II in Abhängigkeit von der jeweiligen Hemmung: In den autophosphorylierungsfähigen Kardiomyozyten führt die Hemmung der NOX2 zu einer Geschwindigkeitsreduktion, in den autophosphorylierungsunfähigen Zellen dagegen bleibt diese Reduktion aus (vgl. Abb. 47). Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die Zugänglichkeit der für die Autoinaktivierung notwendigen Aminosäure Threonin 305/306 in den autophosphorylierungsunfähigen Zellen beeinträchtigt sein könnte. Die genauere Untersuchung dieses interessanten Phänomens bzw. die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den CaMKII-Aktivierungsmechanismen und den CaMKII-Inaktivierungsmechanismen könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

4.5 Gegenüberstellung der zellulären Mikrodomänen

4.5.1 Grundlagen

Die Rolle der CaMKII-Aktivität in den subzellulären Kompartimenten ist in vielen Detailfragen noch unklar (Mohler und Hund 2011). Bekannt ist allerdings, dass viele verschiedene CaMKII-Splicevarianten nicht nur für die CaMKII existieren (Hudmon und Schulman 2002b). Dazu gehören auch solche, die eine spezielle durch Phosphorylierung aktivierte Nukleus-Sequenz besitzen, die vermutlich die Überführung in den Zellkern ermöglicht. Diesen Enzymen wird die Fähigkeit zugesprochen, Kalziumsignale anhand ihrer Frequenz und Amplitude zu unterscheiden und dadurch differenzierte Signale in das Innere des Zellkerns zu übermitteln. Je nach Kalziumsignal werden nukleäre Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und so die Genexpression an die Bedürfnisse der Zelle angepasst (Srinivasan et al. 1994; Heist et al. 1998; Heist und Schulman 1998).

Um das Reaktionsverhalten der CaMKII im Zellkern näher zu beleuchten, wurden von den Versuchsalgorithmen 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1 zusätzlich zu den zytoplasmatischen auch die nukleären Kompartimente ausgewertet. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass innerhalb der Zelle ein Lokalisationsgefälle des Ad-Camui α Sensors existiert: Unter basalen Bedingungen ist das FRET-Signal im Zytosol stärker ausgeprägt als im Nukleus, was darauf schließen lässt, dass Ad-Camui α vermehrt im Zytosol und nicht im Zellkern zu finden ist. Darüber hinaus wurden die Zellkerne vor der Messung zwar markiert, die Messungen selber allerdings epifluoreszenzmikroskopisch und nicht konfokal durchgeführt. Aufgrund dieser Einschränkungen sind die Aussagen über die Aktivität im Zellkern anfällig für Artefakte und es bedarf sicher noch weiterführender Untersuchungen.

4.5.2 Nukleäre Reaktionskinetik unter elektrischer Feldstimulation

Unter elektrischer Feldstimulation ist die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit (k) im Nukleus signifikant langsamer als im Zytosol (vgl. Abb. 35). Die Tatsache, dass dieser Effekt autophosphorylierungsunabhängig ist, bestätigt die bereits geäußerte Annahme (vgl. 4.2), dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit kalziumabhängig ist, offenbar auch im Nukleus. Die Kalziumkonzentration scheint unter elektrischer Feldstimulation im Nukleus geringer zu sein als im Zytoplasma. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die intrazellulären Kalziumspeicher bei Stimulation ihre Kalziumreserven vornehmlich ins Zytoplasma mobilisieren. Ein Anstieg der Kalziumkonzentration im Nukleus ist vermutlich vornehmlich durch Diffusion zu erreichen. Ein Prozess, der Zeit in Anspruch nimmt. Gegebenenfalls würde die nukleäre

4. Diskussion

CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit bei länger andauernder Stimulierung auf das Niveau der zytoplasmatischen ansteigen. Dies könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein. Allerdings ist die FRET ratio im Nukleus unter elektrischer Feldstimulation annähernd so groß wie im Zytoplasma (vgl. Abb. 36). $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ scheint, wie bereits in Abschnitt 4.3 erläutert, nur einen geringen Einfluss auf die FRET ratio zu haben. Allerdings zeigt sich auch kein autophosphorylierungsabhängiger Unterschied innerhalb des nukleären Kompartimentes, vermutlich, weil $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ allein nicht ausreicht, um eine Autophosphorylierung zu erreichen.

4.5.3 Nukleäre Reaktionskinetik unter β -adrenerger Stimulation

Im Gegensatz zur elektrischen Feldstimulation zeigen sich unter β -adrenerger Feldstimulation deutliche autophosphorylierungsabhängigere Effekte: Entsprechend dem Zytoplasma ist die nukleäre Amplitude unter β -adrenerger Stimulation signifikant größer als unter elektrischer Feldstimulation (# in Abb. 36), allerdings nur in den Zellen mit einer erhaltenen Autophosphorylierung. Die Autophosphorylierung scheint auch im Nukleus für die CaMKII-Aktivität entscheidend zu sein, zumindest unter β -adrenerger Stimulation.

Allerdings ist die nukleäre CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter elektrischer Feldstimulation autophosphorylierungsunabhängig größer, als die unter β -adrenerger Stimulation. Dies unterstützt die Theorie, dass die Autophosphorylierung nur marginal an der Beeinflussung der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit beteiligt ist, und dass unter β -adrenerger Stimulation eine geringere Kalziumfreisetzung erzielt wird als unter elektrischer Feldstimulation. Allerdings zeigt sich unter β -adrenerger Stimulation ein wichtiger autophosphorylierungsabhängiger Unterschied zwischen den subzellulären Kompartimenten: In den autophosphorylierungsunfähigen Zellen besteht kein Unterschied zwischen der zytoplasmatischen und der nukleären CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit. In den Zellen, die noch zur Autophosphorylierung fähig sind besteht dieser Unterschied schon (vgl. Abb. 35).

Der im Zytosol beobachtete autophosphorylierungsabhängige CaMKII-Aktivitätsunterschied (Amplitude) unter β -adrenerger Stimulation existiert im Nukleus nicht (vgl. Abb. 36). Dies lässt vermuten, dass die Hemmung der Autophosphorylierung sich im Zytoplasma unter β -adrenerger Stimulation stärker auswirkt als im Nukleus. Möglicherweise hängt dies mit der CaMKII-Mutante zusammen, die als relativ großes Molekül mutmaßlich weniger schnell und weniger einfach in den Zellkern diffundieren kann.

4.5.4 Nukleäre Reaktionskinetik unter Isoproterenol und unter elektrischer Feldstimulation

Kombiniert man die β -adrenerge Stimulation und die elektrische Feldstimulation miteinander, überwiegen im Nukleus analog zum Zytoplasma bezogen auf die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeiten die kalzium-assoziierten Effekte: Die zytosolische CaMKII-Aktivierung ist schneller als die nukleäre, ohne dass die Autophosphorylierung eine Rolle spielt (vgl. Abb. 40). Kombiniert man die elektrische Feldstimulation und die Stimulation der β -Rezeptoren mit Isoproterenol erreicht man im Nukleus eine ähnlich schnelle CaMKII-Aktivierung wie unter alleiniger elektrischer Feldstimulation, aber eine signifikant schnellere als unter alleiniger β -adrenerger Stimulation. Dies entspricht den Verhältnissen im Zytosol.

Im Gegensatz zur CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit ist die nukleäre FRET ratio (Amplitude) autophosphorylierungsabhängig: Die zytoplasmatische Amplitude ist größer als die im Nukleus, allerdings nur in den autophosphorylierungsfähigen Zellen. Wird die Autophosphorylierung gehemmt, sind die zytoplasmatische und die nukleäre Amplitude annähernd gleich (vgl. Abb. 41).

4.5.5 Nukleäre Reaktionskinetik unter Angiotensin II

Unter Anregung mit Angiotensin II zeigt sich eine interessante Abweichung im Vergleich zu den anderen Stimulationsarten: Die Hemmung der Autophosphorylierung führt im Zellkern sonst zu einer Abnahme der CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit und der CaMKII-Aktivität. Nicht so unter Anregung mit ANGII: Sowohl die Amplitude als auch die enzymatische Aktivierungsgeschwindigkeit sind in den autophosphorylierungsunfähigen Zellen größer als im Wildtyp (vgl. Stimulation in Abb. 47 und 48). Dies impliziert, dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter ANGII-Stimulation, im Gegensatz zu den anderen Stimulationsarten, auch autophosphorylierungsabhängig ist. Allerdings scheint eine Autophosphorylierung der CaMKII die Aktivierungsgeschwindigkeit eher zu verlangsamen als zu beschleunigen.

Zusätzlich spielt die Hemmung der NOX2 bzw. der CaMKII-Oxidation eine Rolle: Die Hemmung der NOX2 und der Autophosphorylierung beschleunigt die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit in den autophosphorylierungsunfähigen Zellen gegenüber den Wildtyp-Kardiomyozyten. Wird nur die Autophosphorylierung gehemmt, ist der Geschwindigkeitsunterschied weniger groß. Bezogen auf die CaMKII-Aktivität hat die zusätzliche NOX2-Hemmung die gegenteilige Wirkung (vgl. Abb. 47 und 48).

4. Diskussion

Die Beobachtungen lassen den bereits in 4.4 geäußerten Schluss zu, dass Autophosphorylierung und Oxidation eher zu einer Verlangsamung der CaMKII-Aktivierung beitragen. Allerdings scheint der verlangsamende Effekt durch die Autophosphorylierung größer zu sein als der der Oxidation. Dies entspricht vorpublizierten Daten, bei denen die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit unter β -adrenerger Stimulation gegenüber der unter Angiotensin II deutlich verlangsamt war (Erickson et al. 2011b). Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass unter Anregung mit Angiotensin II eine größere Kalziummobilisation stattfindet als unter β -adrenerger Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das nukleäre CaMKII-Reaktionsverhalten prinzipiell dem im Zytoplasma entspricht. Allerdings sind die zytoplasmatischen k -Konstanten und Amplituden tendenziell schneller bzw. größer als die nukleären, mit Ausnahme der ANGII-vermittelten CaMKII-Aktivität. Das unter Angiotensin II auffällig andere Verhältnis zwischen Zytoplasma und Nukleus ist interessant und sollte in anderen Forschungsprojekten unbedingt weiter untersucht werden.

4.6 Limitierungen der vorliegenden Arbeit und Ausblicke für zukünftige Forschungsprojekte

Ein limitierender Faktor der hier durchgeführten Experimente war trotz der in 4.1. dargelegten Optimierungsmaßnahmen die Güte der Versuchszellen, bedingt durch die toxischen und mechanischen Irritationen im Rahmen von adenoviraler Transduktion und Zellkultur. Dies hat die Durchführung längerer Messprotokolle, die aufgrund der langsamen CaMKII-Reaktionskinetik notwendig sind, erschwert. Abhilfe könnte in zukünftigen Experimenten die Verwendung transgen veränderter Versuchstiere schaffen. Dadurch wäre die Einsparung von Ressourcen und Zeit sowie die Minimierung von Störfaktoren und Artefakten möglich. Nachteilig ist, dass Modulationen von zum Beispiel Effloreszenzgraden schwer umsetzbar sind, und dass die Generierung transgener Versuchstiere mit finanziellem und zeitlichem Aufwand verbunden ist. Deshalb müssten Fragestellungen für die relativ unflexiblen Mausmodelle klar definiert sein und im Vorfeld über Pilot-Experimente weiter eingegrenzt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden lediglich die drei bekannten CaMKII-Aktivierungswege untersucht. Nicht berücksichtigt wurden die enzymatische Autoinaktivierung über Threonin 305/306 und die Auswirkungen der Glykosylierung auf das CaMKII-Reaktionsverhalten.

Um zu überprüfen, ob ein Teil der durch β -adrenerge Stimulation hervorgerufenen CaMKII-Aktivität wie angenommen (vgl. 4.2) oxidationsabhängig ist, würde sich für ein zukünftiges Forschungsprojekt empfehlen, Wildtyp-Zellen und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante mit Isoproterenol und Scramble und mit Isoproterenol und gp91-ds-TAT zu stimulieren. Zu beachten ist, dass dieser Versuchsansatz nicht ausschließt, dass es zu einer NOX2-unabhängigen Oxidation der CaMKII kommen kann.

Außerdem könnte die Beziehung zwischen der autophosphorylierungsabhängigen CaMKII-Aktivität und der cAMP-Signalkaskade näher untersucht werden. Auch das nukleäre CaMKII-Reaktionsverhalten ist nicht abschließend geklärt.

Insgesamt bleiben weiterhin viele Fragen offen, die Gegenstand zukünftiger Experimente sein können.

5. Zusammenfassung

Die multifunktionelle Serin-Threonin-Kinase CaMKII spielt eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Krankheiten. In insuffizienten Kardiomyozyten herrschen erhöhte Expressions- und Aktivitätslevel, die höchst wahrscheinlich maßgeblich zum weiteren Progress der Krankheit beitragen. Dies geschieht nach dem derzeitigen Kenntnisstand auf dem Boden eines chronisch aktiven Sympathikus und einer Hyperaktivität des RAAS, die den insuffizienten Herzmuskel über die autonome CaMKII-Aktivität in einen *circulus vitiosus* treiben. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation das CaMKII-Reaktionsverhalten unter besonderer Berücksichtigung der Autophosphorylierung und der NOX2-abhängigen Oxidation untersucht.

Mit Hilfe der gewonnenen Untersuchungsergebnisse konnte gezeigt werden, dass die CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit autophosphorylierungsunabhängig ist und vor allem durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration bestimmt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das CaMKII-Aktivitätsausmaß vornehmlich durch die Autophosphorylierung bestimmt wird bzw., dass eine maximale CaMKII-Aktivität nur durch Autophosphorylierung erreicht werden kann.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass sich die einzelnen CaMKII-Aktivierungswege wechselseitig beeinflussen. So kann eine Erhöhung der Kalziumkonzentration die Reaktionskinetik unter β -adrenerger Stimulation beschleunigen und eine gleichzeitige Autophosphorylierung scheint die oxidations-vermittelte CaMKII-Aktivierung unter ANGII zu bestärken.

Interessanterweise ist die nukleäre CaMKII-Aktivität unter β -adrenerger Stimulation und unter Oxidation auch autophosphorylierungsabhängig. Allerdings wirkt sich die Autophosphorylierungs-Hemmung stärker im Zytoplasma aus. Die nukleäre CaMKII-Aktivität und CaMKII-Aktivierungsgeschwindigkeit sind fast immer langsamer und geringer als die im Zytoplasma. Außerdem konnte anschaulich dargestellt werden, dass nur die gemeinsame Hemmung von Autophosphorylierung und NOX2-vermittelter CaMKII-Oxidation die kardiotoxischen Auswirkungen der gesteigerten Enzymexpression und Enzymaktivierung verhindert. Die CaMKII-Grundaktivität bleibt dabei erhalten, weil sie nur von der Kalziumkonzentration und nicht von posttranslationalen Modulierungen abhängig ist.

Dieser Ansatz wird in der pharmakologischen Therapie der Herzinsuffizienz durch die Kombination von β -Blockern und RAAS-Hemmern bereits umgesetzt (Authors/Task Force Members et al. 2012). Da diese Therapie allerdings eine hohe Compliance (regelmäßige Einnahme

5. Zusammenfassung

mehrerer Medikamente) erfordert und mit Nebenwirkungen vergesellschaftet ist, könnte eine gezielte und kombinierte Beeinflussung der CaMKII einen großen Gewinn für die Behandlung von Herzinsuffizienzpatienten bedeuten. Aus diesem Grund ist das Reaktionsverhalten der CaMKII auch für zukünftige Forschungsprojekte von großem Interesse.

6. Literaturverzeichnis

- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA (2004): S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 10, 1200–1207
- Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H (1999): Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem* 274, 33644–33653
- Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M, Segal AW (2004): The large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel is essential for innate immunity. *Nature* 427, 853–858
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel - mit Zugang zum Elsevier-Portal. Auflage: 11; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2013
- Alberts B, Johnson A, Walter P, Lewis J, Raff M, Roberts K, Orme N: Molecular Biology of the Cell. Auflage: 5th Revised edition.; Taylor & Francis Ltd., New York 2007
- Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN (2001): Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase α . *Circ Res* 89, 997–1004
- Authors/Task Force Members, McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, et al. (2012): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 33, 1787–1847
- Babior BM (1999): NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973): Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52, 741–744
- Baldrige CW, Gerard RW (1932): The Extra Respiration of Phagocytosis. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 103, 235–236
- Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause EG (1997): The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca^{2+} -independent in intact beating hearts. *FEBS Lett* 409, 131–136
- Barany M (Hrsg.): Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. Academic Press 1995

6. Literaturverzeichnis

- Bedard K, Krause K-H (2007): The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245–313
- Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM (2002): Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 105, 293–296
- Bennett MK, Erondy NE, Kennedy MB (1983): Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J Biol Chem* 258, 12735–12744
- Berne RM, Levy MN: Cardiovascular Physiology. Mosby 2001
- Bers D: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Springer Science & Business Media 2001a
- Bers DM: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Springer Science & Business Media 2001b
- Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198–205
- Bers DM, Grandi E (2009): Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 54, 180–187
- Biswas S, Chida AS, Rahman I (2006): Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol* 71, 551–564
- Bokoch GM, Prossnitz V (1992): Isoprenoid metabolism is required for stimulation of the respiratory burst oxidase of HL-60 cells. *J Clin Invest* 89, 402–408
- Bokoch GM, Diebold BA (2002): Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 100, 2692–2696
- Bokoch GM, Knaus UG (2003): NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 28, 502–508
- Börner S, Schwede F, Schlipp A, Berisha F, Calebiro D, Lohse MJ, Nikolaev VO (2011): FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nature protocols* Vol. 6, 427–438
- Boron WF, Boulpaep EL: Medical Physiology. Saunders, Philadelphia, PA 2002
- Braun AP, Schulman H (1995): The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417–445
- Brunner JD, Lim NK, Schenck S, Duerst A, Dutzler R (2014): X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* 516, 207–212
- Carmeliet E, Vereecke J: Cardiac Cellular Electrophysiology. Springer Science & Business Media 2001

6. Literaturverzeichnis

- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM (2006): NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8, 691–728
- Cerbai E, Sartiani L, De Paoli P, Mugelli A (2000): Isolated cardiac cells for electropharmacological studies. *Pharmacol Res* 42, 1–8
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805
- Chao LH, Pellicena P, Deindl S, Barclay LA, Schulman H, Kuriyan J (2010): Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 264–272
- Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, Berretta R, Potts ST, Marsh JD, Houser SR (2005): Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res* 97, 1009–1017
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001): Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269, 131–140
- Cheung JY, Leaf A, Bonventre JV (1985): Determination of isolated myocyte viability: staining methods and functional criteria. *Basic Res Cardiol* 80 Suppl 1, 23–29
- Cheung WY (1967): Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: pronounced stimulation by snake venom. *Biochem Biophys Res Commun* 29, 478–482
- Cheung WY (1969): Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Preparation of a partially inactive enzyme and its subsequent stimulation by snake venom. *Biochim Biophys Acta* 191, 303–315
- Cheung WY (1970): Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* 38, 533–538
- Cheung WY, Lynch TJ, Wallace RW (1978): An endogenous Ca²⁺-dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9, 233–251
- Cheyoun ERS, Bouallegue A, Srivastava AK (2014): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase- II in vasoactive peptide- induced responses and vascular biology. *Curr Vasc Pharmacol* 12, 249–257
- Clark RA (1986): Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils. *J Immunol* 136, 4617–4622
- Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS (1998): Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 98, 1329–1334
- Coultrap SJ, Buard I, Kulbe JR, Dell'Acqua ML, Bayer KU (2010): CaMKII autonomy is substrate-dependent and further stimulated by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* 285, 17930–17937

6. Literaturverzeichnis

- Crevey BJ, Langer GA, Frank JS (1978): Role of Ca^{2+} in maintenance of rabbit myocardial cell membrane structural and functional integrity. *J Mol Cell Cardiol* 10, 1081–1100
- Cross AR, Segal AW (2004): The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657, 1–22
- DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT (1995): Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7110–7114
- DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM (2000): Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 275, 13986–13993
- DeRemer MF, Saeli RJ, Edelman AM (1992): Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinases Ia and Ib from rat brain I. Identification, purification, and structural comparisons. *J Biol Chem* 267, 13460–13465
- Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, Elimban V, Dent MR, Tappia PS (2009): Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 81, 429–438
- Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH (1990): Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 86, 1729–1737
- Doussi re J, Gaillard J, Vignais PV (1996): Electron transfer across the O_2^- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry* 35, 13400–13410
- Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89–101
- Elstner EF: Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin. Auflage: 529 S.; - Mannheim: Wissenschaftsverlag. SW: „M nchener Sauerstoffclub“, Mannheim 1990
- Enns LC, Pettan-Brewer C, Ladiges W (2010): Protein kinase A is a target for aging and the aging heart. *Aging (Albany NY)* 2, 238–243
- Erickson JR (2014): Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol* 5, 59
- Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, et al. (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462–474
- Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME (2011a): CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev* 91, 889–915
- Erickson JR, Patel R, Ferguson A, Bossuyt J, Bers DM (2011b): Fluorescence resonance energy transfer-based sensor Camui provides new insight into mechanisms of calci-

6. Literaturverzeichnis

- um/calmodulin-dependent protein kinase II activation in intact cardiomyocytes. *Circ Res* 109, 729–738
- Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372–376
- Erondu NE, Kennedy MB (1985): Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J Neurosci* 5, 3270–3277
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ (1996): Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7, 215–222
- Fischer TH, Neef S, Maier LS (2013): The Ca-calmodulin dependent kinase II: a promising target for future antiarrhythmic therapies? *J Mol Cell Cardiol* 58, 182–187
- Fong YL, Taylor WL, Means AR, Soderling TR (1989): Studies of the regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Mutation of threonine 286 to alanine and aspartate. *J Biol Chem* 264, 16759–16763
- Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Physik* 437, 55–75
- Frank JS, Rich TL, Beydler S, Kreman M (1982): Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox. *Circ Res* 51, 117–130
- Gaber E, Wildner M (2011): Themenheft 52 „Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede“.
- Gaertner TR, Kolodziej SJ, Wang D, Kobayashi R, Koomen JM, Stoops JK, Waxham MN (2004): Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 279, 12484–12494
- Gangopadhyay JP, Ikemoto N (2010): Intracellular translocation of calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II during the development of hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 515–521
- Geeves MA, Holmes KC (1999): Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* 68, 687–728
- Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R (2000): A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 87, 26–32
- Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O, Pick E (2000): Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J Biol Chem* 275, 40073–40081

6. Literaturverzeichnis

- Graham FL, Prevec L (1991): Manipulation of adenovirus vectors. *Methods Mol Biol* 7, 109–128
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59–74
- Granados MP, Salido GM, González A, Pariente JA (2006): Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem Cell Biol* 84, 39–48
- Grimm M, Brown JH (2010): Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 48, 322–330
- Groemping Y, Rittinger K (2005): Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386, 401–416
- Guo T, Zhang T, Mestrlil R, Bers DM (2006): Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 99, 398–406
- Hahn NE, Meischl C, Wijnker PJM, Musters RJP, Fornerod M, Janssen HWRM, Paulus WJ, van Rossum AC, Niessen HWM, Krijnen PAJ (2011): NOX2, p22phox and p47phox are targeted to the nuclear pore complex in ischemic cardiomyocytes colocalizing with local reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem* 27, 471–478
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580
- Hanson PI, Schulman H (1992): Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu Rev Biochem* 61, 559–601
- Hauk A (2013): Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* 43, 278–278
- Heger J, Peters SC, Piper H-M, Euler G (2009): SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 220, 515–523
- Heist EK, Schulman H (1998): The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases within the nucleus. *Cell Calcium* 23, 103–114
- Heist EK, Srinivasan M, Schulman H (1998): Phosphorylation at the nuclear localization signal of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II blocks its nuclear targeting. *J Biol Chem* 273, 19763–19771
- Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G, Shah AM (2003): Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 41, 2164–2171
- Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT (1994): Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem* 269, 30749–30752

6. Literaturverzeichnis

- Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 84, 713–721
- Hoelz A, Nairn AC, Kuriyan J (2003): Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Mol Cell* 11, 1241–1251
- Hudmon A, Schulman H (2002a): Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 71, 473–510
- Hudmon A, Schulman H (2002b): Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364, 593–611
- Hudmon A, Schulman H (2002c): Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364, 593–611
- Imlay JA (2003): Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57, 395–418
- Ito T, Matsui Y, Ago T, Ota K, Sumimoto H (2001): Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J* 20, 3938–3946
- Jaboski A (1933): Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* 131
- Jager L, Hausl MA, Rauschhuber C, Wolf NM, Kay MA, Ehrhardt A (2009): A rapid protocol for construction and production of high-capacity adenoviral vectors. *Nat Protocols* 4, 547–564
- Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM (1998): Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem* 273, 35147–35152
- Kalsi JK, Clay K, Rickard D, Hall ND (1993): Suppressive effects of a novel antioxidant compound on human T cell functions in vitro. *Agents Actions* 39 Spec No, C110-112
- Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, Cantley LC, Yaffe MB (2001): The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3, 675–678
- Katoh T, Fujisawa H (1991): Calmodulin-dependent protein kinase II. Kinetic studies on the interaction with substrates and calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 1091, 205–212
- Katz AM: Physiology of the Heart. Auflage: 0005; Lippincott Raven, Philadelphia, PA 2010
- Kemp BE, Parker MW, Hu S, Tiganis T, House C (1994): Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 19, 440–444
- Kettlewell S, Seidler T, Smith GL (2009): The effects of over-expression of the FK506-binding protein FKBP12.6 on K(+) currents in adult rabbit ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 458, 653–660

6. Literaturverzeichnis

- Kochanek S (2001): Gentransfer mit adenoviralen Vektoren. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 44, 1031–1037
- Kreppel F, Gackowski J, Schmidt E, Stefan Kochanek (2005): Combined Genetic and Chemical Capsid Modifications Enable Flexible and Efficient De- and Retargeting of Adenovirus Vectors. Mol Ther 12, 107–117
- Kunikullaya U K, Ananthakrishnan V, Goturu J (2012): Robert Tigerstedt and the discovery of renin - a revisit. Int J Cardiol 158, 1–5
- Kuret J, Schulman H (1984): Purification and characterization of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase from rat brain. Biochemistry 23, 5495–5504
- Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H (2002): The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. EMBO J 21, 6312–6320
- Kutscha W, Brecht K (1961): [The effect of calcium and other alkaline earth ions on acid and ether contracture. A contribution to the problem of electromechanical coupling]. Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere 272, 479–489
- Kwok S, Lee C, Sánchez SA, Hazlett TL, Gratton E, Hayashi Y (2008): Genetically encoded probe for fluorescence lifetime imaging of CaMKII activity. Biochem Biophys Res Commun 369, 519–525
- Lamb GD (2000): Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol 27, 216–224
- Langendorff O (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflügers Arch 61, 291–332
- Langley JN (1898a): On Inhibitory Fibres in the Vagus for the end of the OEsophagus and the Stomach. J Physiol (Lond) 23, 407–414
- Langley JN (1898b): On the Union of Cranial Autonomic (Visceral) Fibres with the Nerve Cells of the Superior Cervical Ganglion. J Physiol (Lond) 23, 240–270
- Lee JC, Edelman AM (1995): Activation of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase Ia is due to direct phosphorylation by its activator. Biochem Biophys Res Commun 210, 631–637
- Leto TL, Adams AG, de Mendez I (1994): Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. Proc Natl Acad Sci USA 91, 10650–10654
- Li J-M, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM (2002): Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. Hypertension 40, 477–484
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. Auflage: 8., völlig neu bearb. Aufl. 2007; Springer, Heidelberg 2006

6. Literaturverzeichnis

- Lottspeich F, Engels JW: Bioanalytik. Auflage: 3. Aufl. 2012; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2012
- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM (2011): Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51, 288–298
- Louis N, Eveleigh C, Graham FL (1997): Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233, 423–429
- Löwel H (2006): Themenheft 33 „Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt“.
- Madigan MT; M John M: Brock Biology of Microorganisms -- Eleventh 11th Edition. Prentice Hall; Eleventh Edition edition; Pearson Prentice Hall 2005
- Maier LS (2009): Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 486–496
- Malvezzi M, Chalat M, Janjusevic R, Picollo A, Terashima H, Menon AK, Accardi A (2013): Ca²⁺-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nat Commun* 4, 2367
- Means AR, Cruzalegui F, LeMagueresse B, Needleman DS, Slaughter GR, Ono T (1991): A novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and a male germ cell-specific calmodulin-binding protein are derived from the same gene. *Mol Cell Biol* 11, 3960–3971
- Metzger JM: Cardiac Cell and Gene Transfer: Principles, Protocols, and Applications. Auflage: 2003; Humana Press, Totowa, N.J 2002
- Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992): Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199–1202
- Mital S, Liao JK (2004): Statins and the myocardium. *Semin Vasc Med* 4, 377–384
- Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ (1998): Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* 39, 280–300
- Mochizuki H, Ito T, Hidaka H (1993): Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase V from rat cerebrum. *J Biol Chem* 268, 9143–9147
- Mohler PJ, Hund TJ (2011): Role of CaMKII in cardiovascular health, disease, and arrhythmia. *Heart Rhythm* 8, 142–144
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, et al. (2002): Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90, E58-65
- Mollova MY, Katus HA, Backs J (2015): Regulation of CaMKII signaling in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 6, 178

6. Literaturverzeichnis

- Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG (2005): ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 274–278
- Muir AR (1967): The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J Anat* 101, 239–261
- Nairn AC, Hemmings HC, Greengard P (1985): Protein kinases in the brain. *Annu Rev Biochem* 54, 931–976
- Nakagami H, Jensen KS, Liao JK (2003): A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms. *Ann Med* 35, 398–403
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999): The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274, 22999–23005
- Noble D: Initiation of the Heartbeat. Oxford University Press, Oxford 1975
- O’Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC (2007): Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 357, 271–296
- Oliver G, Schäfer EA (1895a): On the Physiological Action of Extracts of Pituitary Body and certain other Glandular Organs. *J Physiol* 18, 277–279
- Oliver G, Schäfer EA (1895b): The Physiological Effects of Extracts of the Suprarenal Capsules. *J Physiol* 18, 230–276
- Opie LH: Heart Physiology: From Cell to Circulation. Fourth edition; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2003
- Paclet MH, Coleman AW, Vergnaud S, Morel F (2000): P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* 39, 9302–9310
- Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A (2009): Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* 105, 1204–1212
- Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S: Physiologie. Auflage: 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2014
- Parkos CA, Dinanuer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT (1989): Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 73, 1416–1420
- Patterson SW, Starling EH (1914): On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J Physiol (Lond)* 48, 357–379
- Patterson SW, Piper H, Starling EH (1914): The regulation of the heart beat. *J Physiol (Lond)* 48, 465–513

6. Literaturverzeichnis

- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015): Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 30, 11–26
- Picciotto MR, Czernik AJ, Nairn AC (1993): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. cDNA cloning and identification of autophosphorylation site. *J Biol Chem* 268, 26512–26521
- Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982): Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 14, 397–412
- Piper HM, Jacobson SL, Schwartz P (1988): Determinants of cardiomyocyte development in long-term primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 20, 825–835
- Pschyrembel W, Pschyrembel-Redaktion: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Auflage: 265., neu bearb. Aufl.; De Gruyter, Berlin u.a. 2013
- Purohit A, Rokita AG, Guan X, Chen B, Koval OM, Voigt N, Neef S, Sowa T, Gao Z, Luczak ED, et al. (2013): Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation* 128, 1748–1757
- Rassow J, Hauser K, Netzker R: Biochemie. Auflage: 1; Thieme, Stuttgart
- Rebecchi MJ, Pentyala SN (2000): Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80, 1291–1335
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CGM, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW (2002): Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416, 291–297
- Regazzi R, Kikuchi A, Takai Y, Wollheim CB (1992): The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. *J Biol Chem* 267, 17512–17519
- Rellos P, Pike ACW, Niesen FH, Salah E, Lee WH, von Delft F, Knapp S (2010): Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol* 8, e1000426
- Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ (2001): Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 89, 408–414
- Reynolds PN, Curiel DT (2002): New generation adenoviral vectors improve gene transfer by coxsackie and adenoviral receptor-independent cell entry. *Kidney International* 61, S24–S31
- Ringer S (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol (Lond)* 4, 29–42.3
- Rissanen TT, Ylä-Herttuala S (2007): Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther* 15, 1233–1247

6. Literaturverzeichnis

- Rossi F, Zatti M (1964): Biochemical aspects of phagocytosis in poly-morphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 20, 21–23
- Rostas JA, Dunkley PR (1992): Multiple forms and distribution of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II in brain. *J Neurochem* 59, 1191–1202
- Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, Bichet D, Moyé L, Packer M, Dagenais GR, Sussex B, Arnold JM, Sestier F (1993): Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 22, 390–398
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84, 570–573
- Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela M-K, Backs J, Olson EN, Brown JH, et al. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2, 664–675
- Sakoda T, Kasahara N, Hamamori Y, Kedes L (1999): A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31, 2037–2047
- Sarfstein R, Gorzalczany Y, Mizrahi A, Berdichevsky Y, Molshanski-Mor S, Weinbaum C, Hirshberg M, Dagher M-C, Pick E (2004): Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. *J Biol Chem* 279, 16007–16016
- Saura M, Marquez S, Reventun P, Olea-Herrero N, Arenas MI, Moreno-Gómez-Toledano R, Gómez-Parrizas M, Muñoz-Moreno C, González-Santander M, Zaragoza C, Bosch RJ (2014): Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *FASEB J* 28, 4719–4728
- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Duménil A-M, Seabra MC, Raposo G, Amigorena S (2006): NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205–218
- Sawyer DB, Colucci WS (2000): Mitochondrial oxidative stress in heart failure: „oxygen wastage“ revisited. *Circ Res* 86, 119–120
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Auflage: 30. Aufl. 2007; Springer, Berlin, Heidelberg 2007
- Schrader M, Fahimi HD (2004): Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122, 383–393
- Schulman H, Greengard P (1978): Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by „calcium-dependent regulator“. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 5432–5436

6. Literaturverzeichnis

- Segal AW (2005): How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197–223
- Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R (1981): The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290, 406–409
- Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HHHW, Drummond GR (2008): NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 120, 254–291
- Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E (2003): NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 988, 193–198
- Silverthorn DU: Physiologie - Die komplette Physiologie des Menschen in integrativer Darstellung. Auflage: 4., aktualisierte Auflage; Addison-Wesley Verlag, München; Boston u.a. 2009
- Soderling TR, Chang B, Brickey D (2001): Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 276, 3719–3722
- Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2010): Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150–1161
- Srinivasan M, Edman CF, Schulman H (1994): Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol* 126, 839–852
- Statistisches Bundesamt (Hrsg.): Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2012. (Fachserie 12 Reihe 4); Wiesbaden 2013
- Stevanovic D, Zhang D, Blumenstein A, Djuric D, Heinle H (2009): Effects of hydroperoxides on contractile reactivity and free radical production of porcine brain arteries. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No, 93–97
- Stokes GG (1852): On the Change of Refrangibility of light. *Phil trans* 142, 463–562
- Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ (1997): Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J Neurochem* 68, 2119–2128
- Stratton MM, Chao LH, Schulman H, Kuriyan J (2013): Structural studies on the regulation of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II. *Curr Opin Struct Biol* 23, 292–301
- Sugiura H, Yamauchi T (1993): Effect of ATP on binding of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 1177, 270–274
- Takao K, Okamoto K-I, Nakagawa T, Neve RL, Nagai T, Miyawaki A, Hashikawa T, Kobayashi S, Hayashi Y (2005): Visualization of synaptic Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons. *J Neurosci* 25, 3107–3112

6. Literaturverzeichnis

- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003): Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346–358
- Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L, et al. (2013): Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 61, 111–122
- Török K, Tzortzopoulos A, Grabarek Z, Best SL, Thorogate R (2001): Dual effect of ATP in the activation mechanism of brain Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II by Ca(2+)/calmodulin. *Biochemistry* 40, 14878–14890
- Ullrich V, Bachschmid M (2000): Superoxide as a messenger of endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 1–8
- Velez Rueda JO, Palomeque J, Mattiazzi A (2012): Early apoptosis in different models of cardiac hypertrophy induced by high renin-angiotensin system activity involves CaMKII. *J Appl Physiol* 112, 2110–2120
- Verrecchia F, Hervé JC (1997): Reversible blockade of gap junctional communication by 2,3-butanedione monoxime in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 272, C875-885
- Vignais PV (2002): The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428–1459
- Vinge LE, Raake PW, Koch WJ (2008): Gene therapy in heart failure. *Circ Res* 102, 1458–1470
- Voet JG: Lehrbuch der Biochemie. Auflage: 2. Auflage; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2002
- Volkman N, Martásek P, Roman LJ, Xu X-P, Page C, Swift M, Hanein D, Masters BS (2014): Holoenzyme structures of endothelial nitric oxide synthase - an allosteric role for calmodulin in pivoting the FMN domain for electron transfer. *J Struct Biol* 188, 46–54
- Volz A, Piper HM, Siegmund B, Schwartz P (1991): Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 23, 161–173
- Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, et al. (2011): Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 108, 555–565
- Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, Möllencamp J, Dybkova N, Islam T, Shah AM, Maier LS (2014): NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 75, 206–215

6. Literaturverzeichnis

- Waldmann R, Hanson PI, Schulman H (1990): Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase made Ca^{2+} independent for functional studies. *Biochemistry* 29, 1679–1684
- Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C (2004a): NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* 24, 5516–5524
- Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao R-P, Cheng H (2004b): Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca^{2+} /calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res* 95, 798–806
- Watanabe Y, Iwamoto T, Matsuoka I, Ohkubo S, Ono T, Watano T, Shigekawa M, Kimura J (2001): Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on Na^{+} / Ca^{2+} exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 132, 1317–1325
- WHO MONICA Project (1989): WHO MONICA Project: Objectives and Design. *International Journal of Epidemiology* 18, S29–S37
- Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW (1996): Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem J* 317 (Pt 3), 919–924
- Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL (2003): PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol Cell* 12, 39–50
- Wolska BM, Solaro RJ (1996): Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am J Physiol* 271, H1250–1255
- Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106, 1288–1293
- Xia Z, Liu Y (2001): Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J* 81, 2395–2402
- Xie Y, Sun M, Lou X, Zhang C, Han F, Zhang B, Wang P, Lu Y (2014): Overexpression of PEP-19 suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Pharmacol Sci* 125, 274–282
- Yang E, Schulman H (1999): Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 274, 26199–26208
- Yi X-Y, Li VX, Zhang F, Yi F, Matson DR, Jiang MT, Li P-L (2006): Characteristics and actions of NAD(P)H oxidase on the sarcoplasmic reticulum of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1136–1144

6. Literaturverzeichnis

- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912–919
- Zhao J, Pettigrew GJ, Thomas J, Vandenberg JJ, Delriviere L, Bolton EM, Carmichael A, Martin JL, Marber MS, Lever AML (2002): Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 97, 348–358
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP (2001): Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1607–1612
- Zhu W-Z, Wang S-Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao R-P (2003): Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* 111, 617–625
- Zimmerman AN, Hülsmann WC (1966): Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 211, 646–647
- Zimmerman ANE, Daems W, Hülsmann WC, Snijder J, Wisse E, Durrer D (1967): Morphological Changes of Heart Muscle Caused by Successive Perfusion with Calcium-free and Calcium-containing Solutions (Calcium Paradox). *Cardiovasc Res* 1, 201–209
- Biophysics of Macromolecules (DKFZ, B040): Research: Single Molecule FRET. <http://www.dkfz.de/Macromol/research/smfret.html>; Zugriff am 28.04.2015
- Calcium - calmodulin - CaM kinases | Pancreapedia. <http://www.pancreapedia.org/pathways/ca2%20-calmodulin-cam-kinases>; Zugriff am 28.03.2016
- Cell Counting with Neubauer Chamber. <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cell-article-chamber.php>; Zugriff am 11.09.2014
- Enzyme Nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>; Zugriff am 21.08.2014
- IUBMB Nomenclature Home Page. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>; Zugriff am 21.08.2014
- Nikon MicroscopyU | Fluorescence Microscopy | FRET Basics. <https://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fret/fretintro.html>; Zugriff am 02.05.2015
- Photometrics QV2 Multichannel Imaging Products: Quad-View Simultaneous Imaging System. <http://www.photometrics.com/products/multichannel/qv2.php>; Zugriff am 29.04.2015
- SMART: Main page. <http://smart.embl-heidelberg.de/>; Zugriff am 21.03.2015

6. Literaturverzeichnis

TILL Photonics Polychrome V monochromator | Forums, Questions, Discussions and Help.
<http://www.labwrench.com/?equipment.view/equipmentNo/17752/TILL-Photonics/Polychrome-V-monochromator/>; Zugriff am 29.04.2015

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
ANGII	Angiotensin II
AT1/2	Angiotensin-Rezeptor 1/2
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3 Butanedione monoxime
CaM	Calmodulin (Calcium-modulated Protein)
CaMK	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	Cyclisches Adenosintriphosphat
Camui	GenBank accession number AY92855
CFP	Cyan fluorescent protein
CICR	Calcium induced calcium release
cLSM	Confocal laser scanning microscopy
CRAC	Calcium release activated calcium channel
CsCl	Cäsium-Chlorid-Lösung
CVD	Cardiovascular Diseases
Cytb ₅₅₈	Flavocytochrome b ₅₅₈
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DUOX	Dual oxidase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

7. Anhang

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GDI	GDP dissociation inhibitor
GFP	Green fluorescent protein
gp91 ^{phox}	NAD(P)H-Oxidase 2
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MOI	Multiplicity of Infection
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NOX	NAD(P)H-Oxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
Phox	Phagocytic oxidase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PLC β	Phospholipase C β
PMAC	Plasma membrane calcium ATPase
PO ₄ ²⁻	Phosphatgruppe
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROI	Region of interest
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR2	Kardialer Ryanodinrezeptor
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum-ATPase

7. Anhang

T286A/T2A	Transgene Threonin ^{286/87} CaMKII-Variante (Austausch von Threonin286/7 gegen Alanin)
Thr ²⁸⁶	Threonin 286
WT	Wildtyp-Variante der CaMKII
YFP	Yellow fluorescent protein

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die elektromechanische Kopplung.	9
Abbildung 2 Die kalzium-calmodulin abhängige Aktivierung der CaMK	12
Abbildung 3 Die kardiale β -adrenerge Signaltransduktion und die Rolle von PKA und CaMKII.	14
Abbildung 4 G-Protein-gekoppelter Signalweg der Proteinkinase A	16
Abbildung 5 Generierung von ROS und deren Reduktionspotentiale	17
Abbildung 6 ROS-Quellen	18
Abbildung 7 Mutmaßliche Molekularstruktur der NOX 2 in Anlehnung an indirekte Daten .	20
Abbildung 8 Aktivierungsmechanismus der NOX2: A: Vor Aktivierung B: Nach Aktivierung	21
Abbildung 9 Domänen der NOX2-Untereinheiten	22
Abbildung 10 Schematische Darstellung der CaMKII-Untereinheit.	26
Abbildung 11 Molekularstruktur und Reaktionsmechanismen der CaMKII	28
Abbildung 12 A: Kanülierung des Aortenstumpfes am isolierten Herz B: Koronarperfusion C: Kanülierung des Rattenherzens D: Befestigung im Versuchssetting.	33
Abbildung 13 Adenoviraler Infektionszyklus.	35
Abbildung 14 Aminosäure-Abfolgen innerhalb der regulatorischen CaMKII-Domäne für die Isoformen α , β , γ und δ	36
Abbildung 15 Adenoviraler Biosensor Ad-Camui α	37
Abbildung 16 Funktionsprinzip der cLSM	42
Abbildung 17 Jablonski-Energiediagramm für den Förster Resonanz Energie Transfer.	44
Abbildung 18 A: FRET-Effizienz (E) in Abhängigkeit von der Fluorophor-Distanz B: R0-Berechnung.....	45
Abbildung 19 A: Dipol-Orientierung von Donor und Akzeptor B: Epifluoreszenz-mikroskopisch gemessene Lichtsignale nach CFP und YFP-Anregung	46
Abbildung 20 FRET-Phänomen am Beispiel der Camui α gekoppelten CaMKII A: Konformationsabhängiges FRET-Signal des Transgenen CaMKII-Molekls. B: Fluoreszenz-Emissions-Spektrum von Camui α unter CFP-Anregung vor und nach Ca^{2+} -Zugabe.....	46
Abbildung 21 Funktionsprinzips der Fluoreszenzmikroskopie	47
Abbildung 22 Experimentelles Setting. A: Epifluoreszenz-Setting mit monochromatischer Lichtquelle, CCD-Kamera und Image-Splitter. B: Erweitertes Versuchssettings.	47

7. Anhang

Abbildung 23 Bestimmung des decay slope bzw. Bestimmung der Zeit zwischen YFP prä und YFP post.....	49
Abbildung 24 Elektrode zur Stimulation der Wildtyp (WT)-/Threnonin286-deletierten (T2A)-Kardiomyozyten mittels elektrischer Feldstimulation	52
Abbildung 25 Isolierte elektrische Feldstimulation (Pacing) und isolierte pharmakologische Stimulation mittels Isoproterenol	53
Abbildung 26 Simultane elektrische und pharmakologische Stimulation (2Hz, 20mV + Isoproterenol 0,1µmol/l) und anschließend Fortführung der alleinigen pharmakologischen Stimulation	53
Abbildung 27 Stimulation mit ANGII und gp91-ds-tat oder mit ANGII und Scrambel	54
Abbildung 28 A: Darstellung der Zellfluoreszenz isolierter Ratten-Kardiomyozyten nach Transduktion mit Ad-Camui α . B: Autofluoreszenz im selben Gesichtsfeld.....	58
Abbildung 29 Anteil fluoreszierender Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Viruskonzentration (MOI).....	59
Abbildung 30 Morphologische Kriterien zur qualitativen Zellbeurteilung. A: Gute Zellqualität. B: Schlechte Zellqualität.....	60
Abbildung 31 Prozentualer Anteil der Zellen guter Qualität in Abhängigkeit von der transduzierten Virusmenge (MOI).	61
Abbildung 32 Originalregistrierung unter elektrischer und pharmakologischer Stimulation im Zytoplasma.	64
Abbildung 33 Gegenüberstellung der Reaktionskinetik von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma.	67
Abbildung 34 Gegenüberstellung von WT- und T2A-Kardiomyozyten im nukleären Kompartiment.....	70
Abbildung 35 Two-Way-ANOVA der Geschwindigkeitskonstante k der Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma und im Nukleus.....	73
Abbildung 36 Two-Way-ANOVA der Amplitude der Wildtyp-Zellen (WT) und der Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante im Zytoplasma und im Nukleus.....	75
Abbildung 37 Originalregistrierung unter kombinierter elektrischer Feldstimulation und pharmakologischer Anregung der β -Rezeptoren im Zytosol.	77
Abbildung 38 Gegenüberstellung der Reaktionskinetik von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten, die die CaMKII-Mutante exprimieren (T2A) im Zytoplasma.....	79

7. Anhang

Abbildung 39 Gegenüberstellung der Reaktionskinetik von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante im Zytoplasma.	81
Abbildung 40 Two-Way-ANOVA der Geschwindigkeitskonstante k von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) in Zytoplasma und Nukleus unter kombinierter, unter alleiniger elektrischer Feldstimulation und unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol.	84
Abbildung 41 Two-Way-ANOVA der Amplituden von Wildtyp-Zellen und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) in Zytosol und Nukleus unter kombinierter, unter alleiniger elektrischer Feldstimulation und unter alleiniger Stimulation mit Isoproterenol.	87
Abbildung 42 Originalregistrierung unter pharmakologischer Stimulation mit ANGII im Zytoplasma	89
Abbildung 43 Zytoplasmatische Reaktionsverläufe von Wildtyp-Zellen unter ANGII in Kombination mit Scramble und in Kombination mit gp91-ds-tat.....	91
Abbildung 44 Zytosolische Reaktionsverläufe von autophosphorylierungsunfähigen Kardiomyozyten (T2A) unter ANGII in Kombination mit Scramble oder unter ANGII in Kombination mit gp91-ds-tat	94
Abbildung 45 Nukleäre Reaktionsverläufe von Wildtyp-Zellen (WT) unter ANGII in Kombination mit Scramble und unter ANGII in Kombination mit gp91-ds-tat.....	96
Abbildung 46 Nukleäre Reaktionsverläufe von Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) unter ANGII in Kombination mit Scramble und unter ANGII in Kombination mit gp91-ds-tat.....	99
Abbildung 47 Two-Way-ANOVA der Geschwindigkeitskonstante k von Wildtyp-Zellen (WT) und von Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma/Nukleus unter Stimulation mit ANGII in Kombination mit Scramble/gp-91-ds-TAT	102
Abbildung 48 Two-Way-ANOVA der Amplituden von Wildtyp-Zellen (WT) und Kardiomyozyten mit der CaMKII-Mutante (T2A) im Zytoplasma und im Nukleus unter ANGII.....	104

7.3 Formelverzeichnis

Formel 1 Berechnung der FRET ratio.....	44
Formel 2 Berechnung der FRET-Effizienz	44
Formel 3 Berechnung des Überlappungsintegrals	44
Formel 4 Entfernungsabhängige Berechnung der FRET-Effizienz E.....	45
Formel 5 Berechnung des Förster-Radius.....	45
Formel 6 Berechnung des Korrekturkoeffizienten B	49
Formel 7 Berechnung des Korrekturkoeffizienten D	49
Formel 8 Berechnung des Korrekturfaktors YFP dir	49
Formel 9 Berechnung von YFP dir unter Berücksichtigung der Zeit	49
Formel 10 Berechnung der Intensität im YFP Kanal (YFP corr)	50
Formel 11 Berechnung der korrigierten FRET ration	50

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Isolations- und Kultivierungsmedien	34
Tabelle 2 Extinktionen und Konzentrationen von Ad-Cam α	37
Tabelle 3 Medien Virusgenerierung und Lagerung	39
Tabelle 4 Reagenzien zur Viruspräparation	40
Tabelle 5 Kultivierungsmedien	41
Tabelle 6 GFP-Varianten	43
Tabelle 7 Messlösungen	52
Tabelle 8 Messprotokolle	55
Tabelle 9 Morphologische und elektrophysiologische Zelleigenschaften zur Beurteilung der Zellqualität unter Isolations- und Kulturbedingungen.	60
Tabelle 10 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivitätsgeschwindigkeiten (k) unter den Versuchsbedingungen von 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1.	106
Tabelle 11 Gegenüberstellung der CaMKII-Aktivitäten (Amplituden) unter den Versuchsbedingungen von 3.3.1, 3.4.1 und 3.5.1	106

7.5 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Stefan Wagner für seine kontinuierliche und fortwährende Unterstützung. Besonders dankbar bin ich dafür, dass er mir von Anfang an die Möglichkeit gegeben hat, die Thematik meiner Dissertation mit zu beeinflussen und auch meine eigenen Ideen frei zu entfalten. In produktiven Diskussionen war ein ständiger Austausch über die Fortschritte aber auch über Rückschläge möglich, so dass stets zeitnah praktikable Lösungsansätze gefunden werden konnten. Ich danke ihm für seine konstruktiven Anregungen sowie seine stets ruhige und problemorientierte Art.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Lars Maier bedanken, der die Dissertation mit betreut hat und dadurch das Gelingen maßgeblich ermöglichte.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Gerd Hasenfuß für die wissenschaftliche Unterstützung und die Unterstützung während der klinischen Ausbildung als Assistenzärztin für Kardiologie und Pulmonologie an der Universitätsmedizin in Göttingen.

Auch möchte ich mich bei Professor Dr. Viacheslav Nikolaev bedanken, in dessen Labor ich die Epifluoreszenzmessungen durchführen durfte und der mir bei der Etablierung des Rattenmodels maßgeblich mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Maier, insbesondere Thomas Sowa, Timo Schulte und Felicia Steuer sowie Gudrun Müller aus dem Labor Nikolaev für ihre fortdauernde Unterstützung.

Ich danke meinen Mitdoktoranden, ohne die ein erfolgreiches Abschließen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre, insbesondere Henriette Daniel.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Meinen Großeltern danke ich für die vielen aufbauenden Worte und die ständigen Ermutigungen. Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihr Verständnis und für viele produktive Diskussionen.

7. Anhang

7.6 Lebenslauf

Name Saskia Ines Amlaz
Geburtsdatum 10. Oktober 1987
Geburtsort Nordhorn (NDS)
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig



SCHULBILDUNG

1994 - 2007
Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium Bad Bentheim
Abschluss: Abitur (Note 1,6)

HOCHSCHULAUSBILDUNG

08/2007 – 01/2008
Pflegepraktika:
• Grafschafter Klinikum Nordhorn
• Paulinenkrankenhaus Bad Bentheim

04/2008 – 05/2014
Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen (UMG)

03/2010
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

05/2014
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

02/2013 – 01/2014
Praktisches Jahr:
• Klinikum Oldenburg,
• UMG

Wahlfach: Neurologie

2008/2009
Seminar zum Medizin- und Biorecht

2011
EKG-Seminar (Grundkurs)

2012
EKG-Seminar für Fortgeschrittene

FAMULATUREN

08/2010
Ammerlandklinik Westerstede - Allgemein-/Viszeralchirurgie

02/2012
UMG – Kardiologie

7. Anhang

03/2012	UMG - IMC
04/2012	UMG - Gastroenterologie
09/2012	UMG - Interdisziplinäre Notaufnahme
07/2012	UMG - Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

WS 2009/2010	Wissenschaftliche Hilfskraft: Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)
01-04/2011	Methodenerwerb in der AG orale Biologie und Geweberegeneration (UMG): <ul style="list-style-type: none">• Western blot• PCR• Immunhistochemie
07/2011	Beginn der Promotion in der Arbeitsgruppe für kardiovaskuläre experimentelle Elektrophysiologie und Bildgebung (UMG) Doktorvater: Prof. Dr. L. Maier Betreuer: Dr. S. Wagner <ul style="list-style-type: none">• Promotionsthema: Pharmakokinetische Reaktionsgrundlagen der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II in Kardiomyozyten der Ratte unter Verwendung des Biosensors Camui α• Gö4med-Promotionsstipendium
04/ 2012	78. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim (Posterpräsentation)
08/2012	Europäischer Kardiologenkongress (ESC) München (Posterpräsentation)
03/2016	82. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim (Posterpräsentation)

7. Anhang

	KLINISCHE TÄTIGKEITEN
02/2015 - 10/2018	Assistenzärztin in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der UMG (unter anderem Normalstation IMC, Intensivstation, Echolabor, interdisziplinäre Notaufnahme)
05/2018	Kurs für Notfallmedizin Teil A bis D (Langeoog)
02/2015 – 08/2019	Fortbildungen in den Bereichen Echokardiographie, Sonographie, Notfallsonographie und Sonographie auf der Intensivstation
2016 - 2019	Leitung der Assistentenfortbildung
2016-2019	Leitung der Organisation der ILS- und ALS-Kurse in der Abteilung für Kardiologie und Pulmonologie der UMG

Göttingen, 03.08.2019

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Saskia I. Amlaz

Erklärung

Die Anregung zur Durchführung dieser Dissertation erfolgte durch Prof. Dr. Stefan Wagner, der auch die Ausarbeitung überwachte.